

# **UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILISIERUNG BIOLOGISCHER STRUKTUREN DURCH SCHWERES WASSER**

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des  
Fachbereichs Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**FRANK MEYER**  
aus Pillau

Berlin 1973



# **UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILISIERUNG BIOLOGISCHER STRUKTUREN DURCH SCHWERES WASSER**

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
des  
Fachbereichs Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**FRANK MEYER**  
aus Pillau

**Berlin 1973**



1. Gutachter : Prof. Dr. M. Wenzel

2. Gutachter : Prof. Dr. A. Kreutzberger

Tag der mündlichen Prüfung : 13. 9. 1973

Die vorliegende Arbeit wurde unter  
der Leitung von Herrn Prof. Dr. M.  
W E N Z E L in der Biologisch -  
Chemischen und Isotopen - Abtei -  
lung des Pharmazeutischen Instituts  
der Freien Universität Berlin aus -  
geführt .

Herrn Prof.Dr. M. W E N Z E L  
möchte ich hiermit für die bei der  
Durchführung der Arbeit erhaltenen  
wertvollen Anregungen herzlich dan -  
ken .



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41550802\\_0062](https://archive.org/details/IA41550802_0062)

# INHALT

|                                                                                                                  | Seite   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. EINLEITUNG                                                                                                    | 1 - 2   |
| 2. HAUPTTEIL                                                                                                     |         |
| <u>2.1.</u> Allgemeine Literaturübersicht                                                                        | 3 - 12  |
| Eigene Untersuchungen                                                                                            |         |
| <u>2.2.</u> Schutzeffekt von Schwerem Wasser bei<br>Zellschädigung durch Hyperthermie<br>( in vitro - Versuche ) | 13      |
| 2.2.1. Einfluß auf die aerobe Glykolyse<br>von Ascites-Tumor-Zellen                                              | 13 - 17 |
| 2.2.2. Einfluß auf die DNS - Synthese<br>von verschiedenen Geweben                                               | 18      |
| 2.2.2.1. bei Tumorgeweben mit und<br>ohne Glukosegabe (Ascites-<br>Tumor - und Yoshida-Sarkom-<br>Zellen)        | 18 - 31 |
| 2.2.2.2. bei Normalgeweben mit und<br>ohne Glukosegabe (isolierte<br>Leber- und Nierenzellen)                    | 32 - 35 |
| 2.2.3. Diskussion der Hyperthermie -<br>versuche von Tumor - und<br>Normalzellen                                 | 36 - 45 |
| <u>2.3.</u> Einflüsse von Schwerem Wasser beim<br>Gesamtorganismus ( Fische , in vivo-<br>Versuche )             | 46      |
| 2.3.1. Schutzeffekte von D <sub>2</sub> O bei Tempe-<br>raturveränderungen ( Hypo - und<br>Hyperthermie )        | 47 - 54 |

|                                                                                                          | Seite    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 2.3.2. Diskussion der Hypo - und<br>Hyperthermieversuche von<br>Fischen                                  | 54 - 56  |
| 2.3.3. Hemmung einer Pharmakonwirkung<br>durch Schweres Wasser                                           | 57       |
| 2.3.3.1. Metacain - Narkose bei<br>Fischen                                                               | 57 - 66  |
| 2.3.3.2. Procainmetabolismus bei<br>Fischen                                                              | 66 - 75  |
| 2.3.3.3. Resorption von HTO bei<br>Fischen                                                               | 75 - 82  |
| 2.3.4. Diskussion der Fischversuche                                                                      | 82 - 86  |
| <u>2.4.</u> Allgemeine Diskussion der Ver -<br>suchsergebnisse und Einordnung<br>in die Literaturbefunde | 87 - 92  |
| 3. ZUSAMMENFASSUNG                                                                                       | 93 - 95  |
| 4. EXPERIMENTELLER TEIL<br>( Material und Methoden )                                                     | I - XX   |
| 5. LITERATURVERZEICHNIS                                                                                  | L1 - L13 |

## 1. EINLEITUNG

1933 stellte UREY (3,4) fest , daß die Veränderungen in den chemischen und biochemischen Reaktionsraten , die durch den Austausch von Wasserstoff durch Deuterium bedingt sind , besondere Bedeutungen für biologische Systeme haben .

In der Regel sind Syntheseleistungen in  $D_2O$  geringer als in  $H_2O$  (5-15) . Überraschend waren deshalb die Beobachtungen von KATZ et al. (16) , daß  $D_2O$  - haltige Mäuse bei Röntgen - bestrahlungen eine größere Überlebensdauer haben als entsprechende Kontrollen in  $H_2O$  .

War diese Stabilisierung von Organismen durch Schweres Wasser ein Einzelfall ? Oder kann man generell sagen , daß biochemische Systeme gegen unphysiologische Einflüsse in  $D_2O$  geschützt werden können ?

Schon HATTORI (79) , DEN ' KO (18) und WENZEL und STÖHR (17) konnten mit ihren Untersuchungen zeigen , daß die Syntheseleistungen von Zellen in Schwerem Wasser bei Überwärmung besser sind als bei Vergleichen in normalem Wasser .

Ebenso wie LEWIN (19,20) führen diese Autoren den größeren Schutz der Zellproteine bei Hyperthermie in erster Linie auf die größere Stabilität der sich in  $D_2O$  ausbildenden Deuteriumbrücken gegenüber Wasserstoffbrücken zurück . Dadurch sind Makromoleküle starrer und werden nicht so leicht denaturiert und damit biologisch inaktiv !

An Hand der aufgezeigten Untersuchungsergebnisse anderer Wissenschaftler ist zu erkennen , daß Schweres Wasser bio -

logische Strukturen gegen äußere Einflüsse wie Hyperthermie stabilisieren kann , wenn es anstelle des normalen Wassers als Lösungsmittel verwendet wird .

Daher versuchten wir folgende Probleme mit dieser Arbeit zu lösen und eventuell zu klären :

1. Wird das in vitro - Wachstum von Tumor - und Normalzellen durch künstliches Fieber bei Gebrauch von  $H_2O$  und  $D_2O$  unterschiedlich beeinflußt ?
2. Zeigt sich auch hier eine Stabilitätserhöhung der Gewebe durch  $D_2O$  ?
3. Wirkt  $D_2O$  bei abnorm äußeren Lebensbedingungen nicht nur bei Einzellzellen , sondern auch bei Ganztieren ( Fische ) stabilisierend ?

## 2. HAUPTTEIL

### 2.1. Allgemeine Literaturübersicht

Die Existenz eines schweren Wasserstoffisotops wurde 1931 von BIRGE und MENZEL (1) aus der Differenz zwischen dem auf chemischen Weg ( 1,00778 ) und dem durch Massenspektroskopie ( 1,00756 ) gefundenen Atomgewicht des Wasserstoffs vermutet. 1932 wurde Deuterium von MURPHY , BRICKWEDE und UREY (2) zum ersten Mal nachgewiesen .

Der Wasserstoff besteht zu 99,98549 % aus dem Isotop  ${}^1_1\text{H}$  und zu 0,0145 % aus  ${}^2_1\text{H}$  . Ein drittes Wasserstoffisotop  ${}^3_1\text{H}$  kommt zwar auch natürlich vor , aber nur zu einem verschwindend geringem Ausmaße . Die beiden ersten bilden in der Hitze drei Molekülarten :  $\text{H}_2$  , HD und  $\text{D}_2$  , die in direktem Gleichgewicht zueinander stehen .



Bei Zimmertemperatur dagegen sind im gewöhnlichen Wasserstoffgasgemisch 99,98 %  $\text{H}_2$  , 0,01999 % HD und nur  $1 \cdot 10^{-6}$  %  $\text{D}_2$  enthalten (23) .

### Isotopeneffekte :

Bei keinem Element ist der Massenunterschied und die damit bedingte Differenz der Nullpunktsenergie der Bindungen zwischen einzelnen Isotopen relativ gesehen so groß wie bei Wasserstoff (24) . Wasserstoffisotope zeigen aus diesem

Grunde in ihrem Verhalten stärkere Unterschiede als Isotope anderer Elemente (25) . Folglich muß man sich bei der Anwendung dieses Nuklids stets über den Einfluß von Isotopeneffekten klar werden , weil Versuchsergebnisse sehr häufig nur dann gedeutet werden können .

Da Isotopeneffekte um so kleiner werden , je kleiner der prozentuale Massenunterschied zweier Isotope ist , fallen meßbare Unterschiede im Reaktionsverhalten beim Isotop Kohlenstoff nicht mehr sehr ins Gewicht (24) .

Wird in dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer chemischen Reaktion eine Bindung gelöst , so wird die Reaktionsgeschwindigkeit dann meßbar herabgesetzt , wenn an der Bindung ein schweres Isotop beteiligt ist ( = primärer Isotopeneffekt ) ( 1 ) . Dieser Effekt wird um so größer und deutlicher , je mehr das Massenverhältnis der konkurrierenden Reaktionspartner von eins abweicht (26) .

Der intermolekulare oder kinetische Isotopeneffekt wird meist als Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der nichtmarkierten zur markierten Substanz angegeben , wobei der Index die Nuklidart bezeichnet (26) .

$$\frac{k_H}{k_D} = \text{kinetischer Isotopeneffekt}$$

Sekundärer Isotopeneffekt ist ein Sammelbegriff für jegliches andere kinetische Verhalten einer markierten Substanz . Die Isotopenbindung wird in diesen Fällen während einer Reaktion gar nicht erst geknüpft oder nicht gespalten bzw. die

Lösung oder Verknüpfung erfolgt nicht im geschwindigkeits - bestimmenden Schritt. Dieser Effekt kann sowohl normal als auch invers sein ; darunter versteht man, daß die markierte Verbindung etwas schneller oder etwas langsamer reagieren kann .

Neben den bereits erwähnten kennt man noch den sogenannten Gleichgewichts - Isotopeneffekt , der bei Gas - oder Papier - chromatographie eine entscheidene Rolle spielen kann (26) . Sekundäre Isotopeneffekte können auch als Substituenten - effekte verstanden werden , wonach einer C - D - Bindung ein stärkerer + I - Effekt zukommt als einer entsprechenden C - H - Bindung und einer  $CD_3$  - Gruppe eine schwächere Hyper - konjugation als einer Methylgruppe . Dagegen können sekundäre Wasserstoffisotopeneffekte auch durch geringere Schwingungs - amplituden von D oder T bzw. durch geringere Raumerfüllung von Deuterium oder Tritium im Vergleich zu Wasserstoff verstanden werden (24) . Nach Untersuchungen von BENEDICT et al. (27) dagegen zeigt sich , daß die ermittelte Schwingungsart beider Moleküle (  $H_2O$  und  $D_2O$  ) identisch ist .

#### Chemische Reaktionen in Schwerem Wasser :

Wenn chemische Reaktionen in  $D_2O$  anstatt in  $H_2O$  ablaufen , so muß man bedenken , daß ein sofortiger Isotopenaustausch zwischen dem Lösungsmittel und der darin gelösten Substanz stattfindet , falls diese dissoziabile Wasserstoffatome auf - weist. Die eintretende Deuterierung ermöglicht somit einen Einblick in die Austauschreaktion und Bindungsfestigkeit von H - Atomen in wässrigen Lösungen .

Dies ist bei organischen Verbindungen von großer Wichtigkeit (28,29). Die Bedeutung dieser Austauschreaktionen liegt weiter darin, daß sie Aufschluß über die Abspaltbarkeit von Protonen, über Molekülstrukturen und Reaktionsmechanismen geben kann. Die Geschwindigkeit des H - D - Austausches ist verhältnismäßig groß bei Verbindungen, die unter Bildung von Ionen Wasserstoff als Protonen abgeben oder aufnehmen können; also besonders in Substanzen, bei denen Wasserstoff an Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Halogen gebunden ist. Dagegen kann bei unmittelbar am Kohlenstoff gebundenen H - Atomen ein Austausch mit meßbarer Geschwindigkeit nur dann stattfinden, wenn in direkter Nachbarschaft elektronenziehende Substituenten eine Isomeriemöglichkeit schaffen, z.B. bei  $\text{NO}_2$  - oder CO - Gruppen (28 - 31).

Bei diesen Austauschreaktionen werden zwei Mechanismen angenommen:

einmal der Austausch über Ionen, bei dem ein direkter Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Dissoziationskonstanten zu erwarten ist. Auf der anderen Seite der Austausch über Wasserstoffbrücken (29,32).

Die Gegenwart oder Abwesenheit eines freien Elektronenpaares an dem Atom, an das der auszutauschende Wasserstoff gebunden ist, ist bestimmend dafür, ob die folgende Abspaltung langsam, schnell oder nur mittels Katalysatoren abläuft (33).

Auf Grund der verschiedenen Isotopeneffekte kommt es nach dem sehr schnell stattfindenden Austausch durch Deuterium

zu erheblichen Änderungen von Bindungsenergien bei C - H , N - H und O - H - Bindungen . So ist bei 25 °C eine C - D - Bindung siebenmal , eine N - D - Verknüpfung ungefähr acht - mal und eine O - D - Bindung etwa elfmal stärker als die entsprechende Wasserstoffbrücke . Die Festigkeit solcher Verknüpfungen nimmt bekanntlich bei steigender Temperatur sehr schnell ab (19,21,34,35) .

Qualitative Unterschiede im Verhalten von H<sub>2</sub> und D<sub>2</sub> sind im allgemeinen nicht zu erwarten . Dagegen sind die quantitativen Unterschiede recht erheblich und auffallend (34) ! Es ist bemerkenswert , daß Schweres Wasser generell ein schlechteres Lösungsmittel ist als normales Wasser . So - mit erreicht man in D<sub>2</sub>O stets eine verringerte Ionen - Aktivität des gelösten Stoffes (34 - 37) . Die Ionen Kalium , Natrium und Chlorid besitzen in Schwerem Wasser eine etwa um 20 % kleinere Wanderungsgeschwindigkeit als in H<sub>2</sub>O ; daher muß auch die spezifische Leitfähigkeit einer D<sub>2</sub>O - Lösung dieser Ionen um etwa 20 Prozent geringer sein als eine entsprechend gleichkonzentrierte wässrige Lösung (34,38 - 40) .

#### Physikalisches Verhalten von D<sub>2</sub>O :

Beim Vergleich einiger physikalischer Daten , Konstanten und Parameter des normalen Wassers mit denen des Schweren Wassers ergeben sich mehr oder weniger große Unterschiede . Neben den in Tabelle 1 genannten unterschiedlichen physikalischen Parametern der Lösungsmittel möchte ich noch auf Untersuchungen anderer Autoren hinweisen , die sich in ihren Arbeiten mit dem Verhalten der beiden Medien befaßt haben :

| PHYSIKALISCHE KONSTANTEN VON $H_2O$ UND $D_2O$ |                    |                       |      |
|------------------------------------------------|--------------------|-----------------------|------|
| Parameter                                      | $H_2O$             | $D_2O$                | Lit. |
| Molekulargewicht                               | 18,016             | 20,028                | 41   |
| Dichte (g/ml) 20°C                             | 0,99823            | 1,10539               | 1    |
| Siedepunkt °C, 760 T.                          | 100,00             | 101,43                | 41   |
| Schmelzwärme (cal/M)                           | 1436               | 1515                  | 41   |
| Molwärme (cal/M)                               | 18,02              | 20,18                 | 41   |
| Schmelzpunkt °C                                | 0,00               | 3,82                  | 28   |
| pK - Wert (25°C)                               | 14,000             | 14,869                | 28   |
| Ionenprodukt (22°C)                            | $1 \cdot 10^{-14}$ | $0,16 \cdot 10^{-14}$ | 1    |
| Brechungsindex (20°C)                          | 1,33300            | 1,32844               | 1    |
| Viskosität ( 20°C )                            | 10,09              | 12,60                 | 1    |
| Dielektrizitäts-<br>konstante ( 20°C )         | 80,4               | 80,5                  | 28   |
| Wärmeleitfähigkeit<br>100 °C, W/ (m grad)      | 682                | 641                   | 42   |

Tabelle Nr. 1

Änderungen des Dampfdruckes(43-45) , Größe der Molekel -  
radien (46) , unterschiedliches Abkühlungsvermögen (47,48) ,  
Größe der Gitterstrukturen (49) und Dipolmomente (50) , Be -  
stimmungen zur Oberflächenspannung und zur thermischen Aus -  
dehnung von  $H_2O$  und  $D_2O$  (51) .

### Darstellungsverfahren von $D_2O$ :

Nach der bereits erwähnten Entdeckung des Schweren Wassers im Jahre 1931 gelang es HERTZ (1) reines  $D_2$  aus dem Isotopengemisch des Wasserstoffs durch die Diffusionsmethode darzustellen . Sie beruht auf der Abhängigkeit der Ausstromgeschwindigkeit der Gase von der Größe der Molekulargewichte ( BUNSEN 1857 ) .

Das wichtigste Verfahren zur Darstellung von Deuterium in Form von reinem  $D_2O$  besteht in der stufenweisen Elektrolyse gewöhnlichen Wassers in alkalischer Lösung an Nickelelektroden , wobei der schwere Wasserstoff sich in der Lösung anreichert , während der leichte entweicht (28) . Die Ausbeute ist erklärlicherweise sehr gering . Aus 20 l  $H_2O$  ergeben sich nur 0,1 ml reines  $D_2O$  (52) !

Zur industriellen Darstellung geht man von technischen Elektrolytlaugen aus , die schon einen bis auf das 5 - fach gesteigerten Deuteriumgehalt besitzen (28).

Bei Einhaltung genau definierter Versuchsbedingungen ist die großtechnische Darstellung von  $D_2O$  durch Isotopenaustausch zwischen schwerem Schwefelwasserstoff und gewöhnlichem Wasser zu erwähnen (53-56) :



### Natürliches Vorkommen der Wasserstoffisotope :

Nach der Tabelle Nr. 2 ist eindeutig erkennbar , daß natürlich vorkommendes Wasser (  $H_2O$  ) ein Gemisch verschiedener Isotope darstellt .

| ISOTOPENZUSAMMENSETZUNG DES NATÜRLICH<br>VORKOMMENDEN WASSERS |          |           |             |
|---------------------------------------------------------------|----------|-----------|-------------|
| $H_2O$ 16                                                     | 99,75 %  | HDO 18    | 0,000064 %  |
| $H_2O$ 18                                                     | 0,17 %   | HDO 17    | 0,0000012 % |
| $H_2O$ 17                                                     | 0,037 %  | $D_2O$ 16 | 0,000003 %  |
| HDO 16                                                        | 0,0322 % | $D_2O$ 18 | 0,000001 %  |
|                                                               |          | $D_2O$ 17 |             |

Tabelle Nr. 2

Biochemische Reaktionen in  $D_2O$  :

Wie bereits in der Einleitung kurz angedeutet , zeigen sich fast in allen biologischen , chemischen und physikalischen Prozessen mehr oder weniger deutliche Veränderungen im Reaktionsverhalten der an dem Umsatz beteiligten Partner , wenn diese in  $D_2O$  und nicht in  $H_2O$  ablaufen .

Da wir versuchen wollten , Stabilisierungseffekte bei biologischen Systemen durch Schweres Wasser gegen äußere Einflüsse zu untersuchen , möchte ich hier einige Versuchsergebnisse anderer Autoren auf diesem Gebiet anführen . Dadurch wird es vielleicht möglich, eigene Befunde später besser zu interpretieren ; vor allen Dingen auf dem Gebiet biochemischer Syntheseleistungen verschiedener Gewebearten oder

von Gesamtorganismen in den beiden Medien .

KATZ und CRESPI und andere Autoren (57-61) stellten als größten Effekt des Schweren Wassers fest , daß der gesamte Gewebeorganismus in vitro als auch in vivo verlangsamt wird . 1967 fand FRANK (114) , daß das Wachstum von verschiedenen DNS als auch RNS enthaltenen Viren in 20 - 50 % igem  $D_2O$  deutlich inhibiert wird . Die DNS - Synthese in Geweben von Ratten und Kaninchen ist in Schwerem Wasser nach Untersuchungen von BRAY und THOMSON (62) als auch von HENDERSON (63) stark verringert .

Wenn Algen in  $D_2O$  von hoher Konzentration leben , so bilden sie von sich aus völlig deuterierte Proteine und Stoffwechselprodukte (63,64) .

Bei Untersuchungen über die Atmung von Hefe in Schwerem Wasser haben MISSBACH et al. (174) gefunden , daß diese Zellen nachweisbar sowohl verringerte  $CO_2$  - Produktion als auch  $O_2$  - Verbrauch aufweisen .

Bei einer Vielfalt von enzymatischen - zum Teil lebensnotwendigen - Reaktionen im Gesamtorganismus oder bei Zellsuspensionen (in vivo und in vitro) stellten die meisten Autoren fest , daß in Schwerem Wasser in den verschiedensten Konzentrationen die ermittelten Umsatzraten und Enzymaktivitäten häufig niedrigere Werte aufweisen als die entsprechenden Kontrollen in normalem Wasser (57,66-78) .

Neben den bereits erwähnten Arbeiten über  $D_2O$  von LEWIN (19,20) , KATZ (16,57) , WENZEL und STÖHR (17) und HATTORI (79) , die eine Stabilitätserhöhung biologischer Strukturen in diesem Medium gegen äußere Einflüsse gefunden haben ,

Konnte LOHMANN (80) zeigen : das Enzym Katalase wird in Schwerem Wasser strahlungsunempfindlicher ; dieser  $D_2O$  - Schutzeffekt wird bei größeren Strahlungs Dosen besonders signifikant !

Obwohl sehr viele verschiedene physikalisch - chemische Unterschiede zwischen den beiden Medien  $H_2O$  und  $D_2O$  herrschen und sowohl die untersuchten Reaktionen sehr komplexer Art sind , kann man doch zusammenfassend sagen : Die häufig auftretende Hemmung oder Beeinflussung biochemischer Vorgänge in den Zellen sind meistens direkt abhängig von der verwendeten  $D_2O$  - Konzentration oder von der jeweiligen Einwirkungs dauer !

Die sich beim Deuteriumoxid besonders stark bemerkbar machen - den Isotopeneffekte bewirken bei biologischen Systemen vor allem zwei Dinge : eine allgemeine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit und eine erhebliche Vergrößerung der Stabilität von biologischen Strukturen durch Ausbildung energieärmerer Bindungen !

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 2.2. Schutzeffekt von Schwerem Wasser bei Zellschädigung durch Hyperthermie ( in vitro - Versuche )

#### 2.2.1 Einfluß auf die Glykolyse von Ascites - Tumor - Zellen

Auf Grund photometrischer Bestimmungen konnte LEWIN nachweisen , daß Schweres Wasser die DNS stabilisiert . Die Untersuchungen dieses Autors ergaben , daß die Stabilität der  $\alpha$  - Helix von Lachsspermien in 95 % igem  $D_2O$  in leicht saurem pH - Wert größer ist als bei entsprechendem wässrigen Medium . Dieser  $D_2O$  - Schutzeffekt spiegelt sich in der erhöhten Schmelztemperatur der DNS in Schwerem Wasser wider (19,20) .

HATTORI (79) und DEN ' KO (18) berichten , daß Schweres Wasser einen eindeutigen Stabilisierungseffekt bei biologischen Strukturen gegen Wärmedenaturierung hervorruft . Ebenso wie LEWIN führen auch sie den größeren Schutz der Zellproteine bei Hyperthermie in erster Linie auf die ca. 7 mal stärkeren Deuteriumbrücken gegenüber Wasserstoffbrücken zurück (21,34,35) .

Wie bereits erwähnt , werden in  $D_2O$  Syntheseleistungen von Zellen bei Normaltemperaturen wegen der in diesem Medium auftretenden Isotopeneffekte verlangsamt .

Es ist bekannt , daß Tumorzellen einen großen Teil ihres Energiebedarfes u.a. aus dem in der Glykolyse gebildeten Laktat gewinnen (82) . Durch dieses Endprodukt wird die Tumorzelle leicht übersäuert (83-87,151) .

Auf die genannten Ergebnisse anderer Autoren aufbauend wollten wir versuchen , folgende Fragen zu klären :

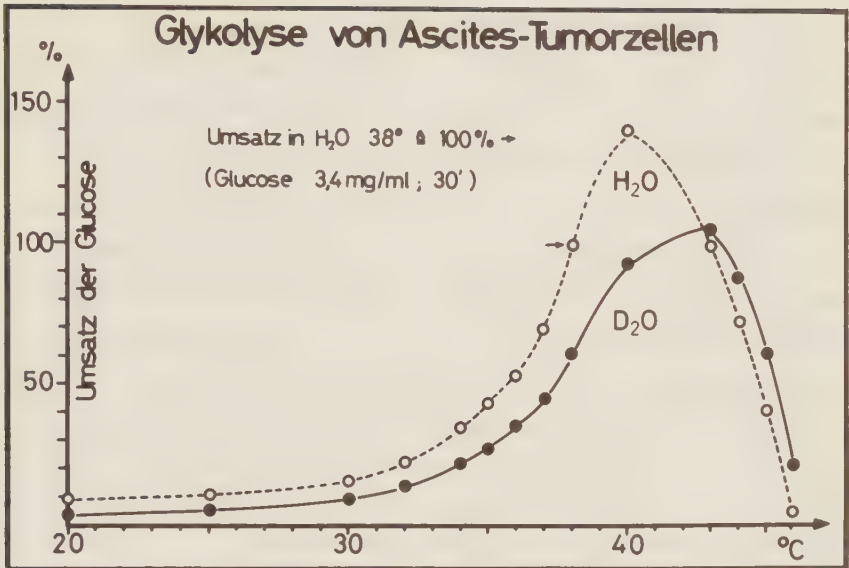
1. Haben Ascites - Tumor - Zellen während der Hyper - thermieperiode bei gleichzeitiger Glukosegabe in 90 % igem  $D_2O$  - Puffer eine andere Glykolyseaktivität als in  $H_2O$  - Puffergemischen ?
2. Zeigen sich - ähnlich wie bei anderen Zellsynthese - leistungen - bei diesem Tumorgewebe meßbare Stabilitäts - effekte in diesem Medium , falls die Zellen überwärmt werden ?

Als Maß der Aktivität der Ascites - Tumor - Zellsuspension galt die von ihr unter diesen Bedingungen gebildete Menge Laktat als Endprodukt der Glykolyse . Bestimmt wurde dieses Produkt mit Hilfe des " optischen Testes " (88) .  
( vergleiche Methodik M 1 und 2 )

Aus der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse ( Abb. Nr. 1 ) ist erkennbar , daß die Glykolyse-Raten in  $H_2O$  bis ca.  $42,5^{\circ}C$  immer über denen des Schweren Wassers liegen . Erst oberhalb dieser Temperatur kreuzt die  $D_2O$  - Kurve die des Wassers . Nach diesem Schnittpunkt fallen beide fast gleichmäßig wieder bis in die Nähe der Anfangswerte ( bei ca.  $20 - 25^{\circ}C$  ) ab ; d.h. oberhalb  $42,5^{\circ}C$  sind die Tumorzellen so gravierend geschädigt worden , daß sie nur noch wenig Glukose zu Laktat umsetzen können .

Diese Ergebnisse können wie folgt interpretiert werden :  
Durch den Isotopeneffekt in  $D_2O$  wird die Reaktionsgeschwindigkeit bis ca.  $42^{\circ}C$  gesenkt (geringere Glykolyseaktivität

Abb. Nr. 1



Temperaturabhängigkeit der Glykolyse von Ascites - Tumorzellen in  $H_2O$  und  $D_2O$

Inkubationsmedium:

$H_2O$  - und 90 % iger  $D_2O$  - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , mit 4 % iger Zellsuspension .

30 minütige Inkubation während Hyperthermie ; Glukose - gabe ( 3,4 mg / ml ) zum Inkubationsmedium vor Reaktions- beginn !

Ordinate :

Glukoseverbrauch von 1,0 ml Ansatz , bezogen auf die Kontrolle bei  $38^\circ C$  in  $H_2O$  = 100 %

Das entspricht : 0,710 mg Glukose = 20,9 % der Aus - gangskonzentration 3,4 mg = 2,09  $\mu$  Mol Glukose = 4,18  $\mu$  Mol Laktat .

= 10,7  $\mu$  Mol Laktat / 100 mg Zellen / 30 Min.

in diesem Medium ) . Oberhalb dieser Temperatur dagegen wird in Schwerem Wasser wieder der von HATTORI (79) und WENZEL und STOHR (17) beschriebene Stabilisierungseffekt sichtbar . In beiden Medien (  $H_2O$  und  $D_2O$  ) werden Tumorzellen durch künstliches Fieber in ihrer Lebensfähigkeit mehr oder weniger stark beeinträchtigt . Aber in Schwerem Wasser tritt die Hemmung der Zellaktivitäten durch Wärme nicht so stark auf . Denn die Enzyme werden gegen äußere Wärmeeinflüsse durch die Ausbildung von Deuteriumbrücken in  $D_2O$  stabiler und daher gegen die Wärmedenaturierung intensiver geschützt . Die direkte Folge davon ist : eine nachweislich höhere Glykolyse - aktivität der Asciteszellen in Schwerem Wasser als in  $H_2O$  !

Bei der Interpretation der Versuchsergebnisse müssen aber zwei entscheidene Faktoren beachtet werden :

1. Durch die Temperaturerhöhung wird die Reaktionsgeschwindigkeit in den Zellen merklich gesteigert ( analog der vant Hoff ' schen Regel ) , d.h. erhebliche Vergrößerung enzymatischer Umsatzraten in den Zellen .

2. Andererseits kommt es jedoch durch die Hyperthermie auch zu einer deutlichen Denaturierung dieser Enzymsysteme , d.h. starke Beeinträchtigung von diesem biologischen Material in seinem Reaktionsvermögen .

Somit stellen die ermittelten Werte für die Glykolyse das Ergebnis zweier entgegengesetzt wirkenden Effekte dar .

Folglich sind verhältnismäßig hohe Temperaturen nötig , bevor der Einfluß der Zellschädigung auf die Glykolyse überwiegt. Aus diesem Grunde können wir den  $D_2O$  - Schutzeffekt

bei Ascites - Tumor - Zellen erst oberhalb von  $42,5^{\circ}\text{C}$  fest - stellen .

Nach Umstellung der Versuchsanordnung wäre es denkbar , diesen  $\text{D}_2\text{O}$  - Stabilisierungseffekt über einen größeren - als wie beschrieben - Temperatur - bereich nachweisen zu können: Man schädigt die Zel - len erst durch Erwärmung auf die angegebene Tempe - ratur (  $38 - 46^{\circ}\text{C}$  ) und mißt anschließend die Glykolyseleistung der Zellen einheitlich bei einer Temperatur ( z.B.  $38^{\circ}\text{C}$  ) . Eine unterschiedliche Laktatbildung durch die Ascites - Tumor - Zellen wäre dann nur eine direkte Folgeerscheinung der vorangegangenen Wärmedenaturierung !

Aber dieser Versuchsidee sind wir im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter gefolgt .

### 2.2.2. Einfluß auf die DNS - Synthese von verschiedenen Geweben

#### 2.2.2.1. bei Tumorzellen mit und ohne Glukose

( Ascites - Tumor - und Yoshida - Sarkom - Zellen )

WENZEL und STÖHR (17) untersuchten den Einfluß von  $D_2O$  und Hyperthermie auf Ascites - Tumor - Zellen . Sie bestimmten die DNS - Syntheseraten in vitro während und nach Hyperthermiephase in  $H_2O$  einerseits und  $D_2O$  andererseits ; desgleichen auch die Auswirkungen von Schwerem Wasser auf das Wachstum dieses Tumorgewebes nach Transplantationen in vivo .

Ihre Ergebnisse während Hyperthermie zeigten , daß in 90 % igem Schweren Wasser bei 43 - 46 °C die DNS - Synthese der Ascites - Tumor - Zellen größer ist als in normalem Wasser . Der geringere Baseneinbau in  $D_2O$  bei niedrigen Temperaturen als in  $H_2O$  dagegen ist wohl auf den bekannten Verzögerungseffekt zurückzuführen , wenn Zellen ihr Zellwasser gegen Schweres Wasser ausgetauscht haben .

Der Thymidineinbau nach Hyperthermie verdeutlicht dagegen , daß Schweres Wasser über den gesamten Temperaturbereich ( 40 - 46 °C ) diese Zellen gegen den schädigenden Einfluß des künstlichen Fiebers schützt . Die niedrigen Einbauraten bei 38 °C in diesem Medium lassen sich wahrscheinlich wieder durch die Reaktionsgeschwindigkeitsverlangsamung auf Grund des auftretenden Isotopeneffektes in  $D_2O$  erklären ; denn nur bei 38 °C sind die  $D_2O$  - Werte unterhalb der vergleichbaren  $H_2O$  - Raten !

Sehr deutlich zeigt sich der Schutzeffekt des Schweren Was -

sers auch bei den von WENZEL und STOHR durchgeführten Trans -  
plantationsversuchen von Ascites - Tumor - Zellen in vivo ,  
Die Tumorübertragbarkeit von Tier zu Tier nach vorausge -  
gangener Hyperthermie ( 44 - 45 °C ) ist in Schwerem Wasser  
noch erfolgreich , während in normalem Wasser kein Wachstum  
mehr nachweisbar war .

Auch sie führen den größeren Schutz der Zellproteine bei  
künstlichem Fieber in erster Linie auf die größere Stabi -  
lität der Deuteriumbrücken gegenüber Wasserstoffbrücken  
zurück .

Hierbei möchte ich auf Versuche von KRUG et al. hinweisen ,  
die bei Normaltemperaturen ebenfalls Tumortransplantationen  
bei Mäusen in  $D_2O$  erfolgreich durchgeführt haben (100) .

Wir wollten nun mit den folgenden Versuchen in erster Linie zwei Fragen klären :

1. Reagieren Yoshida - Sarkom - Zellen in ähnlicher Weise wie die Ascites - Tumor - Zellen unter diesen unphysiologischen Verhältnissen oder zeigen sich bei diesen beiden Gewebearten Unterschiede in den DNS - Syntheseraten ? (17)
2. Welche Effekte ruft dabei exogene Glukose auf Grund ihrer Wirkung bei Tumorgeweben ( Übersäuerung der Zellen durch vergrößerte Laktatbildung (83-87) ) unter diesen Bedingungen hervor ?

Die Yoshida - Sarkom - Zellen , die in Ascites - form vorlagen , wurden für den jeweiligen Versuch in eine 4 % ige Suspension gebracht ( vergl. Methodik M 1 ) . Um die DNS - Syntheseaktivität in diesen Zellen messen zu können , wurde  $^3\text{H}$  - Thymidin in das Inkubationsgemisch gegeben . Während der DNS - Synthese kommt es unter anderem zur Basenpaarung Adenin-Thymin . Da also auch markiertes Thymin bei der Neubildung der DNS mit eingebaut wird , kann man nach Aufarbeitung der Proben durch anschließende Radioaktivitätsmessung auf die DNS - Syntheseleistung rückschließen ( vergl. Methodik M 3 ) .

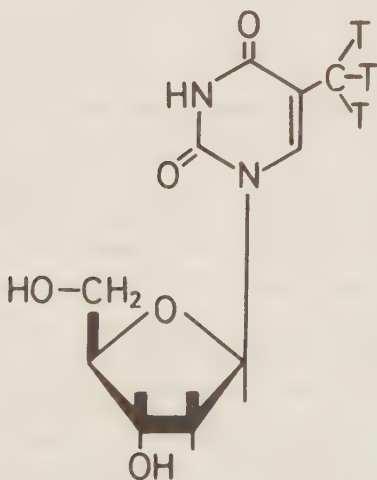
Bei dem Tumorgewebe wurden jeweils zwei Versuchsreihen gegeneübertestellt : Normales Wasser mit und ohne Glukosegabe und 90 % iges Schweres Wasser mit und ohne exogener Glukose in der angegebenen Konzentration . Die jeweilige Glukosegabe

erfolgte dabei bereits vor Hyperthermiebeginn .

Als Kontrollwert für die anschließende Berechnung wurde die in  $\text{H}_2\text{O}$  ohne Glukosegabe bei  $38^\circ\text{C}$  eingebaute Thymidinmenge als 100 % festgelegt !

Um die Hyperthermieeffekte auf die Zellen über einen großen Temperaturbereich verfolgen zu können , inkubierten wir bei  $38^\circ\text{C}$  anfangend bis  $46^\circ\text{C}$  mit einer jeweiligen Temperatur - differenz von  $2^\circ\text{C}$  .

### Thymidin ( methyl-T ) :



Was ist aus der graphischen Darstellung dieser Inkubationsversuche zu ersehen ( Abb. Nr. 2 ) ?

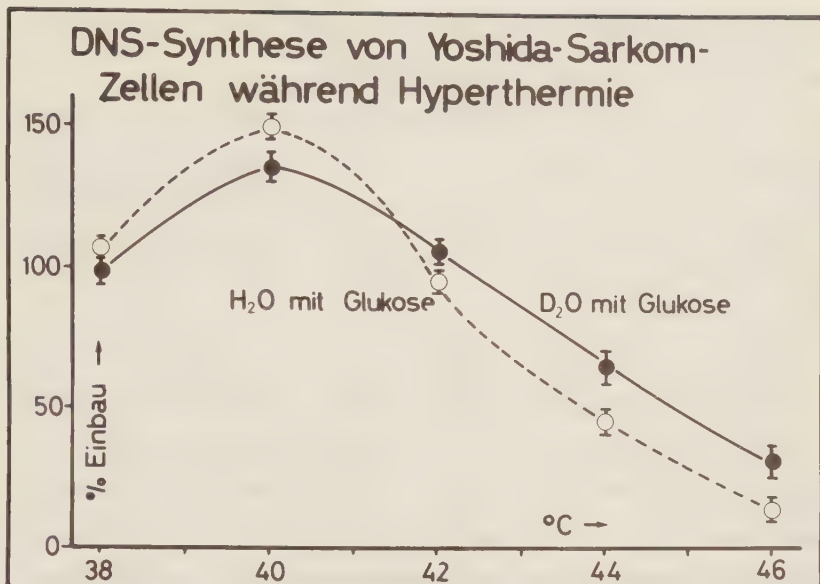
Bis 40 °C steigen die Werte in beiden Medien an und übertreffen dabei auch die Kontrolle von 38 °C in H<sub>2</sub>O . Diese Erscheinung ist wohl eine direkte Folge der Reaktionsgeschwindigkeitserhöhung durch Temperatursteigerung . Nach dieser Temperatur aber fallen die Thymidineinbauraten wieder , um bei 46 °C die niedrigsten Werte zu erreichen .

Bis zu etwa 41,5 °C sind die D<sub>2</sub>O - Werte unterhalb der H<sub>2</sub>O - Raten , um dann aber oberhalb dieser Temperatur diese deutlich zu überschreiten ; das besagt , daß Schweres Wasser in der angebotenen Konzentration biologische Strukturen durch Deuteriumbrückenbildung vor Wärmedenaturierung schützt ! Dieser Stabilisierungseffekt ist besonders gut bei höheren Temperaturen erkennbar .

Der jeweils ermittelte geringere Einbau des Thymidins beim Temperaturbereich von 38 - 41,5 °C in 90 % igem D<sub>2</sub>O ist wahrscheinlich durch den auch von anderen Autoren nachgewiesenen Isotopieeffekt von Schwerem Wasser auf Syntheseleistungen der Zellen erklärbar (17,57-65,79,114) .

An Hand dieser Versuche konnte neben dem bereits von WENZEL und STÖHR (17) beschriebenen D<sub>2</sub>O - Stabilisierungseffekt bei Ascites - Tumor - Zellsuspensionen festgestellt werden : Auch Yoshida - Sarkom - Zellen werden in analoger Weise durch Schweres Wasser während der Hyperthermiephase gegen diesen äußeren schädigenden Einfluß geschützt !  
( vergleiche Signifikanzberechnungen auf S.25 )

Abb. Nr. 2



Einbau von  $^3\text{H}$  - Thymidin in die DNS von Yoshida - Sarkom - Zellen während Hyperthermie in  $\text{H}_2\text{O}$  - und  $\text{D}_2\text{O}$  ( 90 % ig ) .

Inkubationsmedium :

Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , mit exogener Glukose ( 3,4 mg / ml Ansatz ) bereits vor Versuchsbeginn .

Die 4 % ige Zellsuspension wurde in jedem Medium mit  $5 \mu\text{Ci } ^3\text{H} - \text{Thymidin} / \text{ml Ansatz} \hat{=} 6,05 \cdot 10^{-1} \mu\text{Ci} / \text{ml} \hat{=} 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  30 Minuten lang auf die angegebene Temperatur erwärmt .

Nach der Inkubation wurde der Baseneinbau bestimmt .

Ordinate :  $^3\text{H} - \text{Thymidineinbau}$  bei  $38^\circ\text{C}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  als Kontrollpunkt = 100 %

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 5$

An Hand der Signifikanzberechnungen ( vergl. Werte auf S.25 ) für den Thymidineinbau in die DNS von Yoshida - Sarkom - Zellen während der Hyperthermieperiode zeigt sich in  $H_2O$  bei Fehlen oder Zugabe von Glukose kein einheitlicher, signifikanter Unterschied über den gesamten Temperaturbereich . Dagegen wird die DNS - Synthese in  $D_2O$  mit p kleiner 0,001 signifikant erhöht , wenn Glukose dem Inkubationsansatz zugesetzt wird .

Da bei der Deutung der Versuchsergebnisse - wie vorne bereits gesagt (17) - zwei entscheidene Fakten berücksichtigt werden müssen : die Vergrößerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Temperatursteigerung einerseits und die eintretende Wärmedenaturierung andererseits , kann man den  $D_2O$  - Schutzeffekt erst oberhalb von  $41,5^{\circ}C$  feststellen .

Aus diesem Grunde können die Fragen , inwieweit Schweres Wasser und exogene Glukose während Hyperthermiephase die DNS - Syntheseaktivität der Tumorzellen beeinflussen , nicht für den gesamten Temperaturbereich deutlich genug beantwortet werden .

Durch eine Umstellung der Versuchsanordnung kann man dagegen den Stabilisierungseffekt von Schwerem Wasser gegen Hyperthermieschäden über den gesamten Bereich (  $38 - 46^{\circ}C$  ) verfolgen : man schädigt die betreffenden Zellsuspensionen erst durch Überhitzung auf die angegebene Temperatur und mißt anschließend bei Normaltemperatur ( $38^{\circ}C$ ) den Einbau von  $^3H$  - Thymidin in die DNS . Eine unterschiedliche DNS - Syntheseleistung ist dann eindeutig nur eine direkte Folge der

Ermittelte Werte für die Einflüsse von  $D_2O$ ,  $H_2O$  und Glukose auf die DNS - Synthese von Yoshida - Sarkom - Zellen während

Hyperthermie (172,173)

( Abb. Nr. 2 )

Effekte der Glukosegabe :

| <u>Temperatur ( °C )</u> | <u>Medium : <math>H_2O</math></u> | <u>Medium : <math>D_2O</math></u> |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 38 °C                    | p < 0,01                          | p < 0,001                         |
| 40 °C                    | p < 0,01                          | p < 0,001                         |
| 42 °C                    | p = 0,10                          | p < 0,001                         |
| 44 °C                    | p < 0,001                         | p < 0,001                         |
| 46 °C                    | p = 0,50                          | p < 0,001                         |

Die p - Werte ( T - Test ) geben die jeweilige Signifikanz der Unterschiede für die DNS - Synthese mit Glukose und die DNS - Synthese ohne Glukose an !

Effekte von  $H_2O$  und  $D_2O$  :

| <u>Temperatur ( °C )</u> | <u>ohne Glukose</u> | <u>mit Glukose</u> |
|--------------------------|---------------------|--------------------|
| 38 °C                    | p < 0,001           | p < 0,001          |
| 40 °C                    | p < 0,001           | p < 0,001          |
| 42 °C                    | p < 0,001           | p < 0,01           |
| 44 °C                    | p < 0,01            | p < 0,001          |
| 46 °C                    | p < 0,001           | p < 0,001          |

Die p - Werte ( T - Test ) geben die jeweilige Signifikanz der Unterschiede für die DNS - Synthese in  $D_2O$  und die DNS - Synthese in  $H_2O$  an !

aufgetretenen Hyperthermieschädigung !

Somit wurden die 4 % igen Zellsuspensionen in beiden Medien erst 30 Minuten lang auf die angegebene Temperatur erwärmt. Um den Glukoseeinfluß in  $H_2O$  und  $D_2O$  zu untersuchen, wurde ausschließlich in dieser Überhitzungsphase Glukose in der erwähnten Konzentration zum Inkubationsansatz bereits vor Reaktionsbeginn zugesetzt ; außerdem wurde der  $^3H$  - Thymidineinbau ohne Glukose gemessen .

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem  $H_2O$  - bzw.  $D_2O$  - Puffergemisch bei  $38^{\circ}C$  mit radioaktivem Thymidin wiederum 30 Minuten lang im Warburg 'schen Schüttelthermostat erwärmt .

WENZEL und STÖHR (17) haben ihre Hyperthermieversuche in normalem und Schwerem Wasser bei Ascites - Tumor - Zellsuspensionen ausschließlich ohne Glukosegabe durchgeführt . Aus diesem Grunde wurden von uns sowohl Yoshida - Sarkom - als auch Ascites - Tumor - Zellen zu diesen neuen Untersuchungen herangezogen , um die Effekte der Hyperthermie und der exogenen Glukose auf die DNS - Synthese für beide Zellarten in  $H_2O$  und  $D_2O$  direkt unter konstanten Bedingungen vergleichen zu können .

Für beide Tumorgewebe wurden wiederum zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt - analog der Untersuchungen während Hyperthermie bei Yoshida - Sarkom - Zellen :  $H_2O$  - Puffer mit und ohne Glukosegabe und 90 % iger  $D_2O$  - Puffer unter den gleichen Bedingungen .

Als Kontrollwert wurde in diesen Fällen der

$^3\text{H}$  - Thymidineinbau in  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $38^\circ\text{C}$  mit exogener Glukose als 100 % festgelegt .

Wie aus den Ergebnissen gemäß Abb. Nr. 3 - 5 hervorgeht , ist bei einer Erhöhung der Temperatur von  $38^\circ\text{C}$  auf  $40^\circ\text{C}$  die DNS - Synthese in den behandelten Zellen in  $\text{H}_2\text{O}$  gegenüber den Kontrollen bereits merklich verringert . Das weitere Absinken der Einbauraten bis zu  $46^\circ\text{C}$  ist gut erkennbar . Das bedeutet , daß diese biologischen Systeme in ihren Aktivitäten durch künstliches Fieber gravierend geschwächt worden sind .

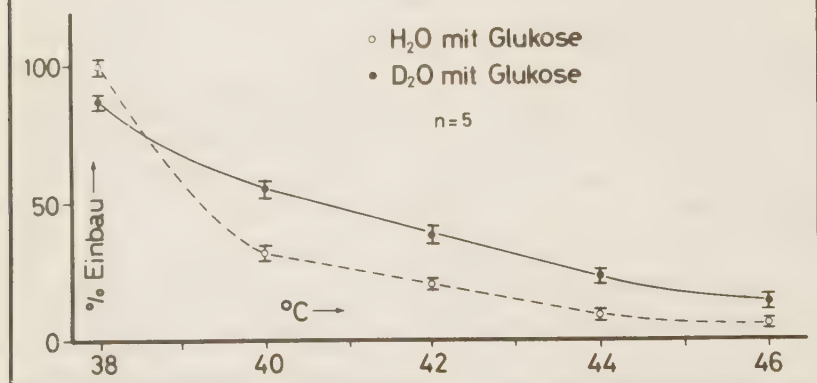
Ganz anders dagegen in Schwerem Wasser : bei  $38^\circ\text{C}$  liegen die Thymidineinbauraten wegen der in diesem Lösungsmittel auftretenden Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit noch etwas unterhalb der entsprechenden  $\text{H}_2\text{O}$  - Werte . Aber schon ab  $40^\circ\text{C}$  ist die DNS - Synthese gegenüber der in normalem Wasser mit p kleiner 0,001 signifikant erhöht ! ( vergl. Werte auf S. 45 )

Welchen Einfluß hat nun exogene Glukose auf die DNS - Syntheseleistung von Tumorzellen , wenn diese Gewebe durch Hyperthermie geschädigt worden sind ?

Im Gegensatz zu der Bestimmung der DNS - Aktivität von Yoshida - Sarkom - Zellen während Hyperthermieperiode ( vergl. Abb. Nr.2 ) wird der  $^3\text{H}$  - Thymidineinbau bei beiden Tumorgeweben nach Hyperthermiephase in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  durch Glukosegabe zwar erhöht , aber der Unterschied ist über den gesamten Temperaturbereich nicht signifikant ( vergl. Werte auf S.45 ).

Wir stellten die Hypothese auf, daß die Atmung der malignen

# DNS-Synthese bei Ascites-Tumor-Zellen nach Hyperthermie



Einbau von  $^3\text{H}$  - Thymidin in die DNS von Ascites - Tumor - Zellen bei 38 °C nach Hyperthermieperiode in  $\text{H}_2\text{O}$  und 90 % igem  $\text{D}_2\text{O}$ .

## Inkubationsmedium :

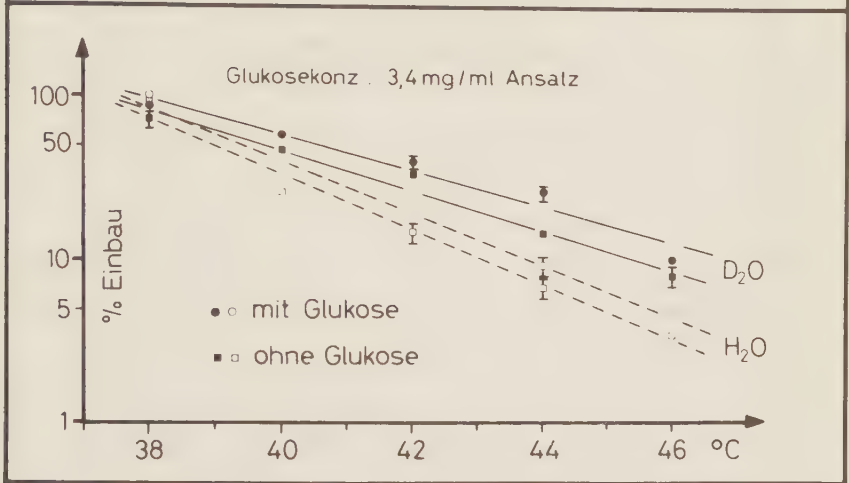
Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , mit exo - gener Glukose ( 3,4 mg / ml Ansatz ) bereits vor Versuchs - beginn .

Die 4 % ige Zellsuspension wurde 30 Minuten lang auf die angegebenen Temperaturen erwärmt . Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem Puffergemisch des jeweiligen Mediums mit 5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  - Thymidin / ml  $\hat{=}$  6,05  $\cdot 10^{-1}$   $\mu\text{Ci}$  / ml  $\hat{=}$  2,5  $\cdot 10^{-6}$  M suspensiert . Glukosegabe fehlte bei dieser neuen Suspension ! Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei 38 °C wurde der Baseneinbau bestimmt .

Ordinate :  $^3\text{H}$  - Thymidineinbau nach 30 minütiger Inkubation der Zellen bei 38 °C ; dann  $^3\text{H}$  - Thymidinzugabe und 30 minütige Nachinkubation bei derselben Temperatur . Kontrollwert in  $\text{H}_2\text{O}$   $\hat{=}$  100 % .

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für n = 5 .

# DNS-Synthese von Ascites-Tumorzellen nach Hyperthermie



Halblogarithmische Darstellung des  $^3\text{H}$  - Thymidineinbaues in die DNS von Ascites - Tumor - Zellen bei 38 °C nach Hyperthermie - phase in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  ( 90 % ig ).

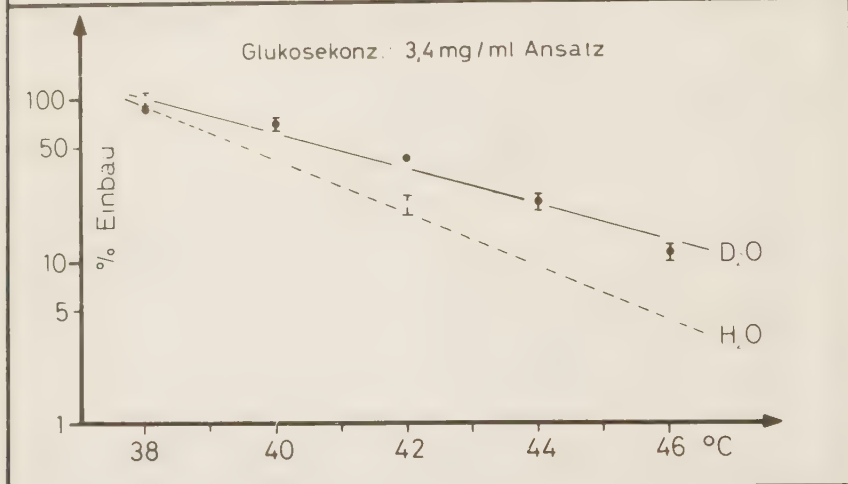
Inkubationsmedium : Krebs-Ringer-Phosphat Puffer , pH = 7,4 .

Die 4 % ige Zellsuspension wurde mit und ohne exogener Glukose (3,4 mg/ml) 30 Minuten lang auf die angegebene Temperatur erwärmt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem Puffergemisch des jeweiligen Mediums mit  $5 \mu\text{Ci } ^3\text{H} - \text{Thymidin/ml} \hat{=} 6.05 \cdot 10^{-1} \gamma / \text{ml} \hat{=} 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  suspensiert . Glukosegabe fehlte bei dieser neuen Suspension ! Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei 38 °C wurde der Baseneinbau bestimmt .

Ordinate :  $^3\text{H} - \text{Thymidineinbau}$  nach 30 Min. Inkubationszeit der Zellen bei 38 °C; dann  $^3\text{H} - \text{Thymidinzugabe}$  und 30 Min. Nachinkubation bei derselben Temperatur. Kontrollwert in  $\text{H}_2\text{O} \hat{=} 100 \%$  .

Die Geraden stellen die für jede Versuchsreihe ermittelten Regressionsgeraden dar ( vergl. Methodik M 3a ). Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 5$  . Bei manchen Meßpunkten war sie so klein , daß sie nicht eingetragen werden konnte !

# DNS-Synthese von Yoshida - Sarkomzellen nach Hyperthermie



Halblogarithmische Darstellung des  $^3\text{H}$  - Thymidineinbaues in die DNS von Yoshida - Sarkom - Zellen bei 38 °C nach Hyperthermie - phase in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  ( 90 % ig ) .

Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer , pH = 7,4 .

Die 4 % ige Zellsuspension wurde mit exogener Glukose (3,4 mg/ml) 30 Minuten lang auf die angegebene Temperatur erwärmt . Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem Puffer - gemisch des jeweiligen Mediums mit  $5 \mu\text{Ci } ^3\text{H} - \text{Thymidin} / \text{ml} \hat{=} 6,05 \cdot 10^{-1} \mu\text{g} / \text{ml} \hat{=} 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  suspensiert . Glukosegabe fehlte bei dieser neuen Suspension ! Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei 38 °C wurde der Baseneinbau bestimmt .

Ordinate :  $^3\text{H} - \text{Thymidineinbau}$  nach 30 Min. Inkubationszeit der Zellen bei 38 °C; dann  $^3\text{H} - \text{Thymidinzugabe}$  und 30 Min. Nachinku - bation bei derselben Temperatur. Kontrollwert in  $\text{H}_2\text{O} \hat{=} 100 \%$  .

Die Geraden stellen die für jede Versuchsreihe ermittelten Re - gressionsgeraden dar ( vergl. Methodik M 3a ) . Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 5$  . Bei manchen Meßpunkten war sie so klein , daß sie nicht eingetragen werden konnte !

Gewebe durch Temperaturerhöhung schneller blockiert werden könnte als die Glykolyse . Dann müßte es den Tumorzellen in beiden Medien bei exogener Glukose möglich sein , die zur DNS - Synthese benötigte Energie vermehrt aus der Glykolyse zu gewinnen . Daher könnte der Stoffwechsel trotz der extremen Bedingungen durch die Überwärmung länger aufrecht erhalten werden , als wenn diese physiologische Substanz fehlte . Die direkte Folge dieses biochemischen Vorganges wäre eine leichte Übersäuerung des Zellmilieus durch vermehrte Laktatbildung (83-87,151) . Nach LEWIN (19,20) sind Deuteriumbrücken in biologischem Material , wie z.B. in der DNS , bei schwach saurem pH stabiler als im Neutralpunkt . Er begründet diese Stabilitätserhöhung mit der Beeinflussung der elektrostatischen Feldstärke negativ geladener Phosphatgruppen in den Nukleinsäuren durch Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration .

Somit sollte man annehmen, daß Tumorzellen gerade in  $D_2O$  gegen die Einflüsse des künstlichen Fiebers mehr geschützt werden als in normalem Wasser ; d.h. bei Glukosegabe müßte nach genügender Stabilisierung dieser biologischen Strukturen durch  $D_2O$  eine verstärkte DNS - Synthese stattfinden . Aber dieser  $D_2O$  - Schutzeffekt konnte an Hand der von uns durchgeführten DNS - Synthesebestimmungen mit Hilfe von von  $^3H$  - Thymidin nach Hyperthermie nicht nachgewiesen werden ! Denn exogene Glukose bewirkt in beiden Medien keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die von uns bestimmte Zellaktivität !

2.2.2.2. bei Normalgeweben mit und ohne Glukosegabe  
( isolierte Leber - und Nierenzellen )

Bei den bis jetzt durchgeführten Untersuchungen haben wir in erster Linie die Einflüsse von 90 % igem  $D_2O$  und von exogener Glukose auf die DNS - Synthese und auf die Glyko - lyse von Tumor - Zellsuspensionen in vitro bei Hyperthermie ( 38 - 46 °C ) ermittelt .

Zeigen sich unter vergleichbaren Versuchsbedingungen bei Verwendung von Normalzellen ( z.B. Leber- und Nierenzellen ) ebenfalls Stabilisierungseffekte durch Schweres Wasser ? Welchen meßbaren Einfluß ruft dabei exogene Glukose hervor ? Schon 1963 fand O ' BRIEN (65) , daß der Hefepilz *Saccharo - myces cerevisiae* in  $D_2O$  angebotene Glukose erheblich lang - samer abbauen kann als in  $H_2O$  .

Da die verwendeten malignen Tumore Ascites - und Yoshida - Sarkom in Suspensionsform vorlagen , mußten wir - um konstante Bedingungen einzu - halten - die beiden Normalgewebe ebenfalls in eine Zellsuspension überführen .

Aus der Literatur ist eine Zellisolierungsmethode mit Trypsin nach DULBECCO und VOGT (102-104) be - kannt. Die Herauslösung der einzelnen Zellen aus ihrem Verband erfolgt durch die Spaltung von Lysyl - und Arginylbindungen in den Peptid - ketten durch dieses Enzym (106) .

(vergleiche Methodik M 4 )

Wir ermittelten die Auswirkungen von  $D_2O$  und Glukose auf die Syntheseleistungen der beiden Normalgewebe ( Leber - und Nierenzellen ) nur nach erfolgter Hyperthermiephase . Wie sich bei den vorherigen Untersuchungen der DNS - Synthese von Tumorgewebe während Überhitzungsperiode gezeigt hatte , ergaben sich bei der Interpretation der Ergebnisse gewisse Schwierigkeiten ( vergl. Abschnitt 2.2.1. und 2.2.2.1. ) .

Wie bei den Bestimmungen des  $^3H$  - Thymidineinbaues in Tumorzellen wurden auch für die verwendeten Normalgewebe jeweils zwei Versuchsreihen gegenübergestellt :

Normales Wasser mit und ohne Glukosegabe und Schweres Wasser in analoger Weise .

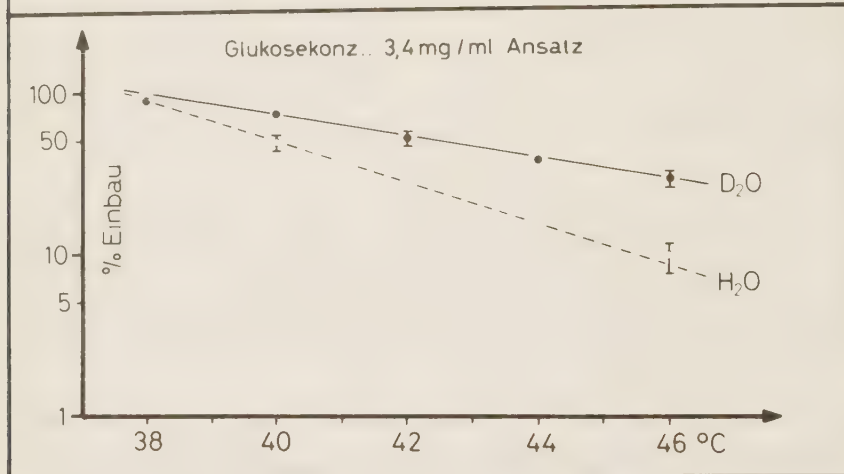
Als Kontrollwert galten auch dieses Mal die in  $H_2O$  mit Glukose bei  $38^\circ C$  eingebauten Thymidinmengen als 100 % .

Wie aus der Temperaturabhängigkeit der DNS - Synthese von Leber - und Nierenzellen in  $H_2O$  und  $D_2O$  ersichtlich , tritt der bereits bei den malignen Tumoren ermittelte  $D_2O$  - Schutzeffekt oberhalb von  $40^\circ C$  gegen Wärmedenaturierung auch bei Normalgewebe auf ( vergl. Abb. Nr. 6 - 8 , Tabellen Nr. 3 und 6 und Signifikanzberechnungen auf Seite 45 ) .

Die exogene Glukose bewirkt - anders als bei den Tumorzellen - vor allen Dingen in  $D_2O$  eine zusätzliche Stabilisierung der Normalzellen .

An Hand der Regressionsgeraden für den  $^3H$  - Thymidineinbau ( Tab. Nr. 6 ) ist ersichtlich , daß die DNS - Synthese in  $H_2O$  durch Glukosegabe nur unerheblich ( nicht signifikant ) , in  $D_2O$  dagegen über den gesamten Temperaturbereich signifikant erhöht werden kann ( vergl. Werte auf Seite 45 ) !

# DNS-Synthese von Leberzellen nach Hyperthermie



Halblogarithmische Darstellung des  $^3\text{H}$  - Thymidineinbaues in die DNS von isolierten Leberzellen bei 38 °C nach Hyperthermie - phase in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  ( 90 % ig ) .

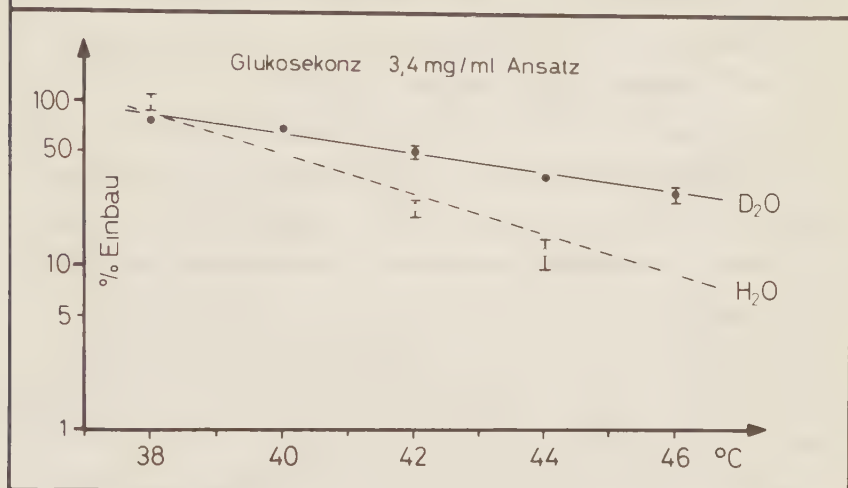
Inkubationsmedium : Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer , pH = 7,4 .

Die 4 % ige Zellsuspension wurde mit exogener Glukose (3,4 mg/ ml) 30 Minuten lang auf die angegebene Temperatur erwärmt . Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem Puffer - gemisch des jeweiligen Mediums mit  $5 \mu\text{Ci } ^3\text{H} - \text{Thymidin} / \text{ml} \hat{=} 6,05 \cdot 10^{-1} \mu\text{g} / \text{ml} \hat{=} 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  suspendiert . Glukosegabe fehlte bei dieser neuen Suspension ! Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei 38 °C wurde der Baseneinbau bestimmt .

Ordinate :  $^3\text{H} - \text{Thymidineinbau}$  nach 30 Min. Inkubationszeit der Zellen bei 38 °C; dann  $^3\text{H} - \text{Thymidinzugabe}$  und 30 Min. Nachinku - bation bei derselben Temperatur. Kontrollwert in  $\text{H}_2\text{O} \hat{=} 100 \%$  .

Die Geraden stellen die für jede Versuchsreihe ermittelten Re - gressionsgeraden dar ( vergl. Methodik M 3 a ) . Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 5$  . Bei manchen Meßpunkten war sie so klein , daß sie nicht eingetragen werden konnte !

# DNS-Synthese von Nierenzellen nach Hyperthermie



Halblogarithmische Darstellung des  $^3\text{H}$  - Thymidineinbaues in die DNS von isolierten Nierenzellen bei 38 °C nach Hyperthermiephase in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  ( 90 % ig ).

Inkubationsmedium : Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer , pH = 7,4 .

Die 4 % ige Zellsuspension wurde mit exogener Glukose(3,4 mg/ml) 30 Minuten lang auf die angegebene Temperatur erwärmt . Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in neuem Puffergemisch des jeweiligen Mediums mit 5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  - Thymidin / ml  $\hat{=}$  6,05 . 10<sup>-1</sup>  $\gamma$  / ml = 2,5 . 10<sup>-6</sup> M suspendiert . Glukosegabe fehlte bei dieser neuen Suspension ! Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei 38 °C wurde der Baseneinbau bestimmt .

Ordinate :  $^3\text{H}$  - Thymidineinbau nach 30 Min. Inkubationszeit der Zellen bei 38 °C; dann  $^3\text{H}$  - Thymidinzugabe und 30 Min. Nachinkubation bei derselben Temperatur. Kontrollwert in  $\text{H}_2\text{O}$   $\hat{=}$  100 % .

Die Geraden stellen die für jede Versuchsreihe ermittelten Regressionsgeraden dar ( vergl. Methodik M 3 a ) . Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für n = 5 . Bei manchen Meßpunkten war sie so klein , daß sie nicht eingetragen werden konnte !

### 2.2.3. Diskussion der Hyperthermieversuche (in vitro) von Tumor - und von Normalzellen

Bei der Bestimmung der Glykolyseaktivität von Ascites - Tumor - Zellen in 90 % igem  $D_2O$  und  $H_2O$  bei Temperaturen von 20 - 46 °C konnten wir folgendes feststellen:

ATZ - Zellen, deren Zellwasser durch Schweres Wasser bereits vor Versuchsbeginn ersetzt worden ist, zeigen bei Temperaturen von 20 - 42,5 °C wegen der durch den Isotopeneffekt bekannten Reaktionsgeschwindigkeitsverlangsamung in diesem Medium geringere Syntheseaktivitäten als vergleichbare Zellen in  $H_2O$ . Bei der von uns verwendeten Versuchsanordnung macht sich der  $D_2O$  - Stabilisierungseffekt biologischer Systeme erst oberhalb von 42,5°C bemerkbar. Denn bis zu dieser Temperatur konkurrieren zwei gleichzeitig ablaufende Reaktionen miteinander :

1. die Reaktionsgeschwindigkeitserhöhung durch Temperatursteigerung, d.h. in unserem Fall Erhöhung der Glykolyseaktivitäten in den Tumorzellen und
2. die auftretende Wärmedenaturierung dieses Gewebes, d.h. Inhibierung von Enzymaktivitäten.

So sind verhältnismäßig hohe Temperaturen notwendig, um den  $D_2O$  - Schutzeffekt verdeutlichen zu können!

Bei den Ascites- Tumor - Zellen zeigt sich in Schwerem Wasser wegen der in diesem Medium auftretenden Deuteriumbrückenbildung eine geringere Wärmedenaturierung!

Somit können wir in  $D_2O$  trotz erhöhter Temperatur größere Zellaktivitäten messen als bei den Kontrollen in  $H_2O$ ! (Abb.Nr.1)

Um ausschließlich die Auswirkung der Hyperthermie auf die DNS - Synthese bei zwei Tumor - und zwei Normalgeweben studieren zu können , wurden die jeweiligen Zellsuspensionen erst durch eine 30 minütige Überhitzungsphase auf die angegebene Temperatur ( 38 - 46 °C ) geschädigt . Danach wurden die DNS-Syntheseleistungen durch den Einbau von  $^3\text{H}$  - Thymidin einheitlich bei 38 °C nach ebenfalls 30 minütiger Inkubation gemessen . Eine unterschiedliche Thymidineinbaurrate ist dann nur eine direkte Folge der vorherigen Wärmedenaturierung !

Schon aus den Regressionsgeraden für die DNS - Synthesen der beiden Normalzellen nach Hyperthermie (Abb. Nr. 6 und 7 ) und aus den ermittelten Signifikanzberechnungen für diese Gewebearten ( vergl. Werte auf Seite 45 ) in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  ist ersichtlich, daß Schweres Wasser die Zellen gegen durch künstliches Fieber verursachte Schäden schützt! (vergl. Tabelle 3 und Abb. Nr. 8)

Auch ein Einfluß der exogenen Glukose während Hyperthermie in  $\text{D}_2\text{O}$  auf Normalzellen scheint nachweisbar: denn die Einbauraten mit Glukosegabe sind in Schwerem Wasser gegenüber denen ohne Glukose über den gesamten Temperaturbereich signifikant erhöht! Dieser "Glukoseeffekt" zeigt sich dagegen nicht in normalem Wasser.

Dagegen konnten wir für die beiden Tumorgewebe nur einen  $\text{D}_2\text{O}$  - Schutzeffekt auf die DNS - Synthese nach Hyperthermieperiode feststellen (vergl. Abb. Nr. 4 und 5 und Werte auf S. 45 für die Signifikanzberechnungen) ! Denn nur in Schwerem Wasser sind die Zellsyntheseleistungen gegenüber denen in  $\text{H}_2\text{O}$  signifikant erhöht. Nach unseren Ergebnissen zeigt sich jedoch

durch Glukosegabe in der Hyperthermiephase bei dieser Art der Zellen kein meßbarer Effekt auf die DNS- Synthese, denn die Einbauraten mit und ohne Glukose unterscheiden sich nicht signifikant von einander!

Tumorzellen werden nach Untersuchungen anderer Autoren nach Gabe von Glukose durch das in der Glykolyse gebildete Laktat leicht übersäuert (83 - 87, 151). Obwohl Deuteriumbrücken gerade bei diesem pH - Wert besonders stabil sein sollen (19;20), konnten wir diese Ergebnisse mit unseren Versuchen der DNS - Synthesebestimmung bei Ascites-Tumor - und Yoshida-Sarkom- Zellen nicht erhärten!

Welche Aussagen kann man über das Verhalten der 4 verwendeten Zelltypen bei diesen Überhitzungsversuchen in beiden Medien machen? Schweres Wasser schützt aufgrund der Ausbildung von starken Deuteriumbrücken biologische Systeme gegen Wärmedenaturierung. Zusätzlich wird in  $D_2O$  die DNS - Synthese in Normalgeweben, nicht aber in Tumorgeweben, durch exogene Glukose signifikant unter den von uns gewählten Bedingungen erhöht. Dieser "Glukoseeffekt" zeigt sich bei allen 4 Zellarten nicht in  $H_2O$  !

Gibt es nun eine rechnerische Methode, diesen  $D_2O$ - Schutzeffekt zahlenmäßig zu belegen ?

Man definiert diesen Einfluß in Bezug auf die DNS - Synthese als Quotienten von

% Thymidineinbau in Schwerem Wasser

% Thymidineinbau in normalem Wasser .

Liegt dieser Wert über eins, so ist die Zellaktivität für das entsprechende Gewebe in  $D_2O$  größer als in  $H_2O$ ; ist er jedoch kleiner als 1, so überwiegt der Thymidineinbau in  $H_2O$ .

Aus der Abbildung Nr. 8 ist eindeutig erkennbar, daß der  $D_2O$  - Stabilisierungseffekt mit steigender Temperatur immer größere Werte annimmt, um bei  $46^\circ C$  dann wieder etwas kleiner zu werden.

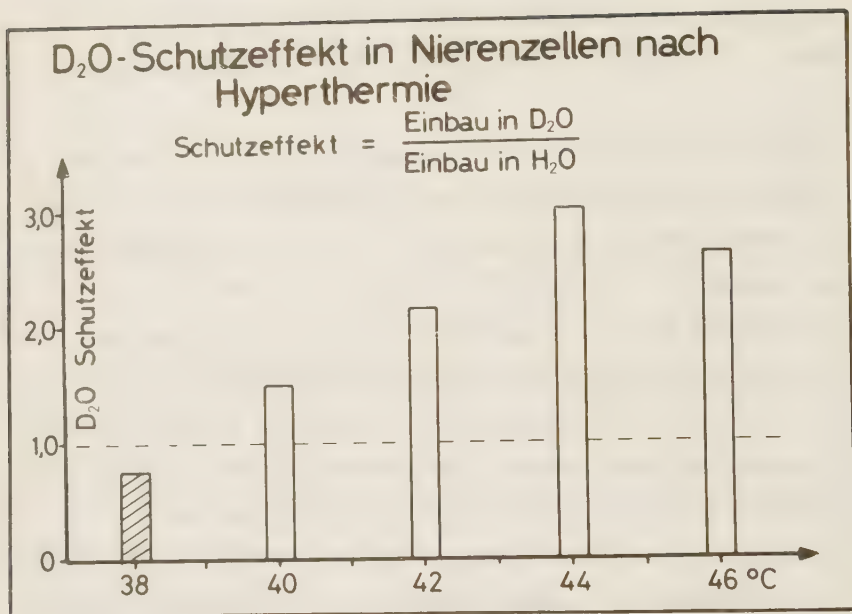
Um den oben für die Nierenzellen über den gesamten Temperaturbereich aufgezeigten Schutzeffekt des Schweren Wassers auch für die drei anderen Gewebearten (Ascites - Tumor-, Yoshida - Sarkom- und Leberzellen) auszugsweise vergleichen zu können, kann man die Werte aus Tabelle Nr. 3 heranziehen.

Bei  $38^\circ C$  ist ein Schutzeffekt von  $D_2O$  auf die Zellen nicht feststellbar. Bei dieser Temperatur überwiegt die Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit in diesem Medium. Die DNS - Synthese ist in  $D_2O$  gegenüber den Einbauraten in  $H_2O$  gehemmt. Bei  $44^\circ C$  dagegen liegen die Quotienten über 1 !

Es zeigt sich, daß Eiweißstrukturen und Makromoleküle in biologischen Systemen - wie z.B. in Tumor - und Normalzellen - durch die Ausbildung von Deuteriumbrücken in ihrer natürlichen Konformation gefestigt werden können; d.h. durch diese Stabilitätserhöhung in  $D_2O$  sind, gemäß der Temperaturabhängigkeit des  $^3H$ -Thymidineinbaues in die DNS dieser Zelltypen, biologische Funktionen und Zellaktivitäten in diesem Medium länger gewährleistet als in  $H_2O$ .

Nach Ergebnissen anderer Autoren reagieren Tumorzellen gegenüber Wärme empfindlicher als Normalzellen (89 -99). Ist es an

Abb. Nr. 8



Schutzeffekt von D<sub>2</sub>O auf die Schädigung der DNS - Synthese durch Hyperthermie

Versuchsanordnung und Thymidineinbauwerte vergl. Abb.Nr.7

Es wurden in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O jeweils die <sup>3</sup>H - Thymidineinbau -  
raten in die DNS der isolierten Nierenzellen bei exogener  
Glukose ( 3,4 mg / ml Ansatz ) zur Berechnung des D<sub>2</sub>O -  
Schutzeffektes herangezogen !

Die zu den Quotienten gehörigen Standardabweichungen konnten  
nicht mit eingezeichnet werden , da sie in dem verwendeten  
Maßstab zu klein erschienen !

D<sub>2</sub>O - SCHUTZEFFEKT

auf die DNS - Synthese nach Hyperthermie  
bei Normal - und Tumorgewebe ( bei exo -  
gener Glukose )

Die Zahlenwerte geben an :

% Thymidineinbau in D<sub>2</sub>O

% Thymidineinbau in H<sub>2</sub>O

| Gewebeart | Temp.: 38 °C | Temp.: 44 °C |
|-----------|--------------|--------------|
| Leber     | 0,87         | 2,23         |
| Niere     | 0,75         | 2,96         |
| Ascites   | 0,87         | 2,93         |
| Yoshida   | 0,84         | 2,32         |

Tabelle Nr. 3

vergleiche Abb. Nr. 3 - 7

Hand der eigenen Versuche möglich, diese Feststellung zu bestätigen oder zeigen sich in dieser Hinsicht Unterschiede?

Um diese wichtige Frage beantworten zu können, kann man die halblogarithmische Darstellungsweise der DNS - Synthesen für die vier verschiedenen Zellarten heranziehen (Abb. Nr. 4 - 7). Trägt man die prozentualen  $^3\text{H}$  - Thymidineinbauraten logarithmisch und die Temperatur linear auf, so ist es möglich, die "biologische Halbwertsttemperatur" für jede Gewebesuspension zu ermitteln. Das ist die Temperatur, bei der nur noch 50 % der Syntheseaktivität in den Zellen nachweisbar sind (ausgehend von den jeweiligen  $38^\circ\text{C}$  - Werten der entsprechenden Geraden ).

Diese Zahlenwerte stellen einen Maßstab für den Grad der Schädigung der DNS durch Hyperthermie dar (Tabelle Nr. 4 und 6 und Werte für Signifikanzberechnungen S. 45 ). Aus den Werten der Tabelle 4 zeigt sich in  $\text{H}_2\text{O}$  kein signifikanter Unterschied der Temperaturempfindlichkeit bei Tumorzellen und Normalzellen. Jedoch wird in 90 % igem  $\text{D}_2\text{O}$  bei malignem Gewebe die DNS - Synthese durch künstliches Fieber stärker gehemmt als bei Normalgewebe.

Auch der Effekt der Glukose auf die DNS - Synthese der verwendeten Gewebearten spiegelt sich in den Werten der Tabelle 4 wider. Wie bereits vorne gesagt (vergl. S. 37 ) wirkt sich dieser physiologische Stoff nur in  $\text{D}_2\text{O}$  auf die Zellaktivität der Normalgewebe signifikant aus. Dagegen finden wir den die DNS - Synthese unterstützenden Einfluß der Glukose nicht bei Tumorzellen !

Welche Fehlermöglichkeiten können beim Bereiten der jeweiligen

TEMPERATUR FÜR REDUKTION DES THYMIDINEINBAUES

AUF 50 % DER KONTROLLE

| Gewebeart               | erwärmt in H <sub>2</sub> O |                  | erwärmt in D <sub>2</sub> O |                  |
|-------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|
|                         | -Gluk.<br>( °C )            | +Gluk.<br>( °C ) | -Gluk.<br>( °C )            | +Gluk.<br>( °C ) |
| Leber<br>(trypsin.)     | 39,90<br>± 0,57             | 39,99<br>± 0,85  | 42,23<br>± 0,29             | 43,17<br>± 0,27  |
| Niere<br>(trypsin.)     | 38,82<br>± 0,32             | 38,86<br>± 0,82  | 42,30<br>± 0,49             | 44,06<br>± 0,56  |
| Ascites<br>( E L D )    | 39,25<br>± 0,25             | 39,43<br>± 0,49  | 40,89<br>± 0,39             | 41,17<br>± 0,52  |
| Yoschida<br>(Ascites F) | 39,50<br>± 0,59             | 39,55<br>± 0,48  | 40,91<br>± 0,48             | 41,46<br>± 0,43  |

Tabelle Nr.4

Effekt der Hyperthermie in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O auf die DNS -  
Synthese

Experimente vergleiche Abb. Nr. 3 - 7

Die jeweiligen Temperaturwerte wurden an Hand der entsprechenden Regressionsgeraden ermittelt ( vergl. Methodik M 3 a ) .

± Angaben entsprechen den Werten S<sub>x.y</sub> der Regressionsgeraden für die einzelnen Versuchsreihen .

Versuchsanordnung vergl. M 3 und M 3 a .

### Zellsuspensionen auftreten ?

Die beiden Tumorgewebe liegen vor Versuchsbeginn in vivo als Einzelzelle ( Ascitesform ) vor . Daher ist es hier verhältnismäßig einfach , die Suspension nach Tötung der Tiere zu gewinnen und anschließend auf den Gehalt von 4 % Zellen einzustellen ( vergl. Methodik M 1 ) .

Dagegen muß beim Herstellen der Normalzellensuspensionen ( Leber - und Nierengewebe ) nach einer Vorschrift von DUL - BECCO und VOGT (102-104) mit Hilfe von Trypsin unbedingt darauf geachtet werden , daß die angegebenen Temperaturen und Zeiten beim Isolieren der Einzelzelle aus ihrem Zellverband strikt eingehalten werden ! Sonst erhält man geschädigte Zellen oder auch nur Zellverbände , die verständlicherweise in ihren Syntheseleistungen sich stark von denen unterscheiden , die als intakte Einzelzelle vorliegen .

Ermittelte Werte für die Einflüsse von  $D_2O$ ,  $H_2O$  und Glukose auf die DNS - Synthese von Normal - und Tumorzellen nach

Hyperthermie (172,173)

( Abb. Nr. 4 - 7 )

Effekte von  $H_2O$  und  $D_2O$  ( vergl. Werte aus Tabelle Nr. 4 ) :

| <u>Gewebeart :</u> | <u>ohne Glukose</u> | <u>mit Glukose</u> |
|--------------------|---------------------|--------------------|
| Leber (tryp.)      | $p < 0,001$         | $p < 0,001$        |
| Niere (tryp.)      | $p < 0,001$         | $p < 0,001$        |
| Ascites (ELD)      | $p < 0,001$         | $p < 0,001$        |
| Yoshida            | $p < 0,01$          | $p < 0,001$        |

Die p - Werte ( T - Test ) geben für die entsprechende Gewebeart die jeweilige Signifikanz der Unterschiede für die DNS - Synthese in  $D_2O$  und die DNS - Synthese in  $H_2O$  an !

Effekte der exogenen Glukose ( vergl. Tabelle Nr. 6 ) :

| <u>Gewebeart :</u> | <u>Medium : <math>H_2O</math></u> | <u>Medium : <math>D_2O</math></u> |
|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Leber (tryp.)      | $0,1048 \hat{=} p = 0,85$         | $2,5383 \hat{=} p < 0,001$        |
| Niere (tryp.)      | $1,4716 \hat{=} p = 0,95$         | $5,1513 \hat{=} p < 0,001$        |
| Ascites (ELD)      | $0,4971 \hat{=} p = 0,50$         | $0,4882 \hat{=} p = 0,35$         |
| Yoshida            | $0,9706 \hat{=} p = 0,85$         | $1,3316 \hat{=} p = 0,09$         |

Die Werte sind ein Maß für die Signifikanz der Unterschiede der DNS - Synthese bei Inkubation einmal mit und einmal ohne Glukosegabe. Für einen p - Wert von 0,05 liegt die Signifikanzschranke bei 2,45 ! ( vergl. Regressionsgeraden ) .

### 2.3. EINFLÜSSE VON D<sub>2</sub>O BEIM GESAMTORGANISMUS

Nachdem wir den Einfluß von Schwerem Wasser auf die DNS - Synthese in Tumor - und Normalgeweben und auf die Glykolyse - aktivität von Ascites - Tumor - Zellen bei Hyperthermie im molekularbiologischen Bereich untersucht haben , wollten wir mit den folgenden Versuchsreihen herausfinden , ob D<sub>2</sub>O beim Gesamtorganismus ebenfalls Stabilisierungseffekte gegen äußere Einflüsse aufweist .

Der Einfachheit halber nahmen wir als Versuchstiere Fische , da diese nach Untersuchungen von HEVSEY und HEFER (81) und nach LEHR , WENZEL und WERNER (109) innerhalb von 1 - 2 Std. ihr gesamtes Körperwasser gegen vorhandenes Aquariumwasser austauschen . Somit konnten wir sicher sein , daß nach einer gewissen Gewöhnungszeit an das neue Medium das angebotene D<sub>2</sub>O im gesamten Organismus der Tiere gleichmäßig verteilt ist .

TAYLOR et al. (107) , MACHT et al. (108) und auch LEHR et al. (109) haben den Einfluß des Lösungsmittels D<sub>2</sub>O auf den Gesamtorganismus verschiedener Fischarten ( *Carassius auratus* und *Xiphoporus spec.* ) untersucht . Sie stellten dabei fest , daß bei diesen Tieren in Schwerem Wasser bis zu einer Konzentration von 45 % keine erkennbaren Nebenwirkungen auftraten. Jedoch oberhalb dieser Grenze starben die Fische innerhalb kurzer Zeit !

Auf Grund dieser Ergebnisse nahmen wir bei allen folgenden Fischversuchen Schweres Wasser in einer Konzentration zwischen 5 und 40 % , um etwaige Todesfälle durch das Lösungsmittel ausschließen zu können !

2.3.1. Schutzeffekte von D<sub>2</sub>O bei Temperaturänderungen  
( Hypo - und Hyperthermie )

Welche Schutzeffekte zeigt Schweres Wasser bei Fischen (Black Mollies, *Mollienisia spec.*), wenn diese unter nicht physiologischen Verhältnissen leben müssen? Zeigt sich z.B. bei Hypothermie auf 3 °C als auch bei Hyperthermie auf über 45 °C eine Stabilisierung durch das neue Medium bei diesen biologischen Systemen ? ( 101,110,111)

Hypothermieversuche:

Als richtungsweisender Vorversuch wurden ca. 0,9 g schwere Black Mollies auf verschiedene Wassertemperaturen (von 0 °C bis 10 °C) unterkühlt und die Zeiten gemessen, innerhalb welcher sie zu Boden sanken und die Kiementätigkeit einstellten. Nach verschieden langer Zeit im Unterkühlungsbad wurden die Fische wieder in Becken überführt, die Wasser von Normaltemperatur ( 25 °C ) enthielten. Nach kurzer Zeit zeigten die Versuchstiere dann wieder Kiementätigkeit und Flossenbewegungen und anschließend normales Verhalten. Da diese Zeiten bei 3 °C verhältnismäßig gut zu messen waren, nahmen wir diese Temperatur als Unterkühlungstemperatur!

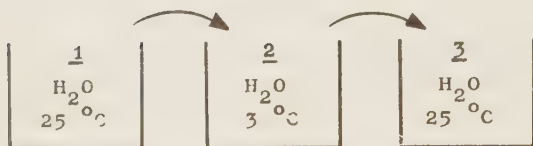
Beim folgenden Hauptversuch wurden die Tiere nach dem aufgezeichneten Schema (vergl. S. 48 ) in H<sub>2</sub>O kurzfristig auf 3 °C abgekühlt, ohne dabei die Luftzufuhr zu stoppen.

Beim Überführen aus dem Aquariumbecken mit Normaltemperatur (25 °C ) in das Kältebecken zeigten die Black Mollies zunächst noch für kurze Zeit

Schema für die Hypothermieversuche in  $H_2O$  und  $D_2O$  bei

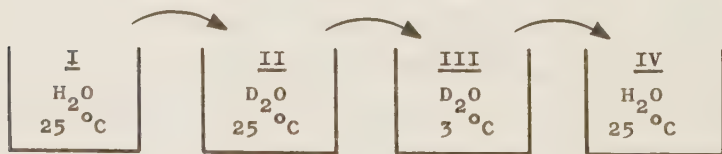
Fischen

( vergl. Abb. Nr.10 )



Versuchsanordnung in  $H_2O$

Je ein Fisch wurde aus Becken 1 entnommen und in Becken 2 verschieden lang unterkühlt . Danach wurde in Becken 3 die Zeit bestimmt , nach der dieser Fisch wieder normales Verhalten zeigte !



Versuchsanordnung in  $D_2O$

Je ein Fisch wurde aus Becken I entnommen und in Becken II ca. 1 - 2 Stunden an das neue Medium gewöhnt . Nach dieser Zeit wurde das Tier verschieden lang in Becken III unterkühlt . Danach wurde in Becken IV die Zeit bestimmt , nach der der Fisch wieder normales Verhalten zeigte .

sehr heftige und schnelle Bewegungen, um anschließend zu Boden zu sinken. Sie legten sich auf eine Seite oder auf den Rücken und stellten ihre Kiemenatmung vollkommen ein. Auch bei ständiger Luftzufuhr blieben die Fische gänzlich unbeweglich und ruhig !

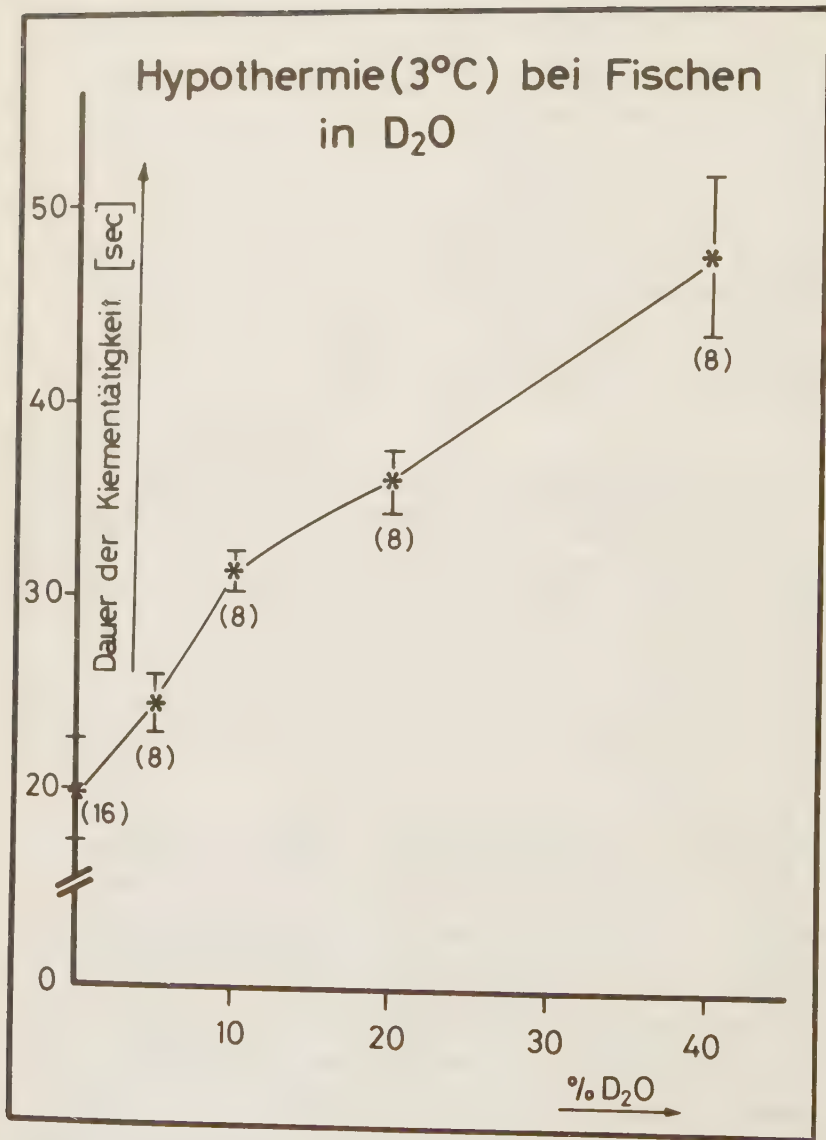
Nach anschließender Überführung in ein Aquariumbecken mit 25 °C Wassertemperatur erholten sich die Black Mollies zusehends und verhielten sich bald wieder normal (Orientierung, gleichmäßige Flossenbewegungen, Reaktionen auf mechanische Reize ).

Fische, die an Schweres Wasser mit steigender Konzentration ( 5 - 40 % ) vorher ca. 1 - 2 Stunden gewöhnt worden waren, wurden ebenfalls auf 3 °C verschieden lang ( 1 - 30 Min. ) abgekühlt (vergl. Schema auf Seite 48 ). An Hand der Abb. Nr. 9 kann man die Zeiten vergleichen, wie lange die Tiere in beiden Medien im Kältebad noch Kiementätigkeit zeigten und nach denen die Fische wieder normales Verhalten erlangten (Abb. Nr. 10 ).

Dabei läßt sich eindeutig erkennen , daß  $D_2O$  - Fische mit steigender  $D_2O$  - Konzentration immer später die Kiementätigkeit einstellten ! Weiterhin ist aus Abb. Nr. 9 ersichtlich , daß der Schutzeffekt des Schweren Wassers gegen die Auswirkungen der Hypothermie bei geringen Konzentrationen im Verhältnis größer ist als bei höheren ( verschieden große Steigung der Kurve ) !

Der Kurvenverlauf in Abb. Nr 10 verdeutlicht , daß nach der

Abb. Nr. 9



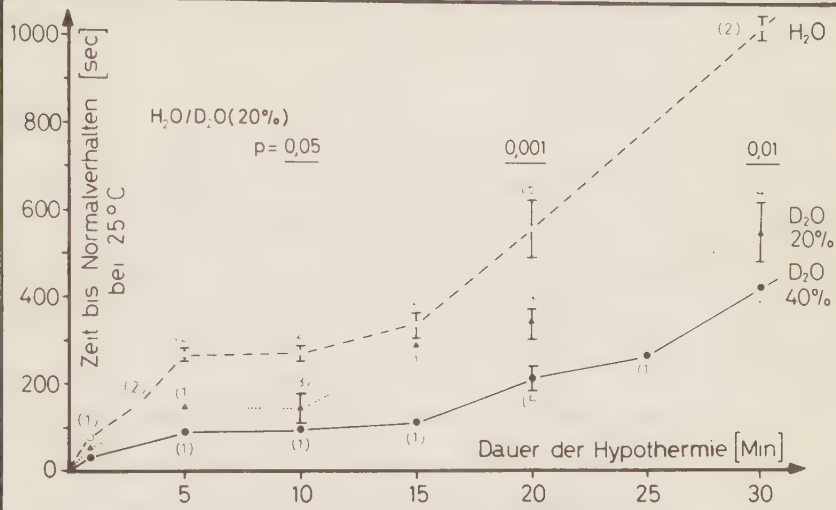
Versuchsanordnung vergl. Abb. Nr. 10

Es wurden die Zeiten bestimmt, wie lange die Fische in den jeweiligen Unterkühlungsbecken noch Kiemen - atmung zeigten.

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Abb. Nr. 10

# Wiedereintritt normalen Verhaltens bei Fischen nach Hypothermie ( 3 °C )



## Wiedereintritt normalen Verhaltens bei Fischen nach Hypothermie ( 3 °C ) in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O .

Die Fische wurden aus den Gewöhungsbecken ( 25 °C ) , gefüllt mit Mischungen aus Wasser mit Schwerem Wasser ( 20 - 40 % D<sub>2</sub>O - Gesamtkonzentration ) oder nur mit Aquariumwasser ( 0 % D<sub>2</sub>O ) , in die Unterkühlungsbecken ( 3 °C ) mit gleichem D<sub>2</sub>O - Gehalt überführt .

Nach verschieden langer Hypothermiedauer wurden die Tiere wieder aus diesen Becken herausgenommen und in Gefäße mit 25 °C Aquariumwassertemperatur ( nur H<sub>2</sub>O ) überführt. ( vergl. Schema Seite 48 ).

Es wurden die Zeiten bestimmt , nach denen die Fische wieder normales Verhalten ( Orientierung , Reaktionen auf äußere mechanische Reize etc. ) zeigten .

Die Unterkühlungsbecken wurden durch Eiswasser auf die angegebene Temperatur ( 3 °C ± 1 ° ) gehalten ; Messung mit Hilfe eines geeichten Thermometers .

p gibt die nach T - Test ermittelten Signifikanzen zwischen den Werten in H<sub>2</sub>O und 20 % D<sub>2</sub>O an .

jeweiligen Hypothermiephase  $D_2O$  - Fische mit steigender  $D_2O$  - Konzentration signifikant schneller wieder normales Verhalten erlangen als entsprechende  $H_2O$  - Tiere.

#### Hyperthermieversuche :

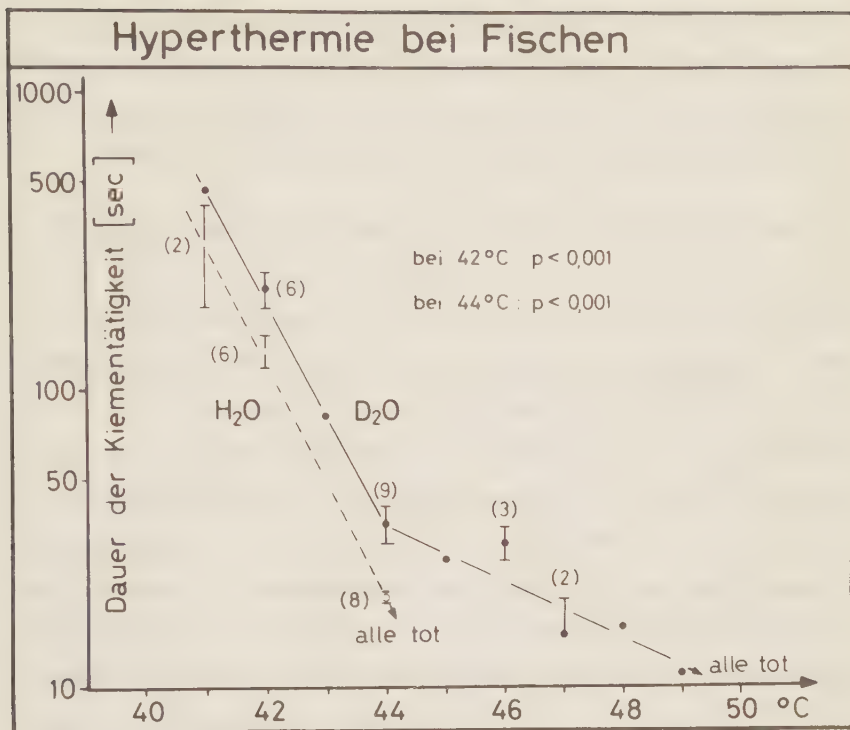
Welchen Einfluß hat 40 % iges Schweres Wasser auf Fische (Black Mollies ), wenn diese in Aquarienbecken leben müssen, die über die Normaltemperatur (  $25^{\circ}C$  ) hinaus erhitzt werden ? Als Kontrolltiere gelten auch hier wieder  $H_2O$  - Fische unter den gleichen Bedingungen.

Analog zum Hypothermieversuch wurden ca. 0,9 g schwere Fische aus Becken mit Normaltemperatur in Glasbehälter überführt, die vorher auf die jeweilig angegebene Temperatur erwärmt worden waren. Nach gewissen Zeiten verloren die Versuchstiere trotz genügender Luftzufuhr die Orientierung und stellten danach auch Flossenbewegungen und die Kiemenatmung ein.

Aus Abb. Nr. 11 ist zu erkennen, daß Fische in 40% igem  $D_2O$  trotz erhöhter Temperatur erheblich später ihre Kiemenatmung einstellen als entsprechende Kontrolltiere !

In der Abbildung Nr. 11 zeigt sich weiterhin deutlich, daß die Black Mollies in Schwerem Wasser bei Hyperthermie später sterben als die vergleichbaren Kontrollen ! ( Eintritt des Todes in  $D_2O$  (40 % ig) bei Temperaturen oberhalb von  $49^{\circ}C$  und in  $H_2O$  bereits oberhalb von  $44^{\circ}C$  )

Abb. Nr. 11



#### Einfluß von erhöhten Temperaturen bei Fischen in H<sub>2</sub>O u. D<sub>2</sub>O

Die Fische wurden aus den Gewöhnungsbecken ( 25 °C ) . ge-  
güllt mit Aquariumwasser ( 0 % D<sub>2</sub>O ) oder mit einer Mischung  
aus Aquariumwasser mit Schwerem Wasser ( 40 % Gesamtkonzen-  
tration ) in die Überhitzungsbecken mit gleichen Mischungen  
überführt ( Temperaturen dieser Becken : 41 - 49 °C ) .

Es wurden die Zeiten bestimmt , wie lange die Fische in den  
jeweiligen Überhitzungsbecken ( H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O ) noch Kiemen-  
tätigkeit zeigten .

Unterhalb von 41 °C konnten keine Angaben gemacht werden ,  
da auch nach 1500 sec. keine sichtbaren Effekte auf die  
Kiemenatmung auftraten !

p gibt die ermittelten Signifikanzen zwischen den Werten in  
den beiden Medien bei 42 °C und 44 °C an für n = 6 / 6 und  
8 / 9 ! ( nach T - Test ) .

Die Versuchstemperaturen wurden mit Hilfe eines Thermostaten  
konstant gehalten ( ± 0,1 °C ) .

Die Meßpunkte ohne Zahlenangaben in Klammern gelten für n = 1 ,  
mit Zahlenangaben in Klammern die bei dieser Temperatur ver-  
wendte Anzahl der Fische .

Bei einer Wiederholung dieser Unterkühlungsversuche zeigten sich in der Tendenz sehr ähnliche Ergebnisse. Nur stellten wir fest, daß die Grenzwerte verschoben waren. So starben die Tiere in  $H_2O$  bereits oberhalb von  $43^{\circ}C$  und in  $D_2O$  oberhalb von  $46^{\circ}C$ . Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses unterschiedliche Verhalten haben wir nicht finden können !

### 2.3.2. DISKUSSION DER HYPO- UND HYPERTHERMIE BEI FISCHEN

Sowohl während der verschiedenen Untersuchungen als auch nach Beendigung der Hypo- und Hyperthermiephase starben nur sehr wenige Black Mollies.

Die Effekte von  $D_2O$  in den verwendeten Konzentrationen schaden augenscheinlich den Tieren nicht, was mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt (107- 109). Vielmehr muß man feststellen, daß sowohl bei der Unterkühlung als auch bei der Überhitzung  $D_2O$  - Fische diese ungewohnten extremen Lebensbedingungen entschieden besser vertragen als Vergleichstiere in normalem Wasser !

Mit einfacheren biologischen Systemen fanden DEN ' KO (18) und auch MAO und HUANG (112) bei Hyperthermieversuchen ähnliche Schutzeffekte des Schweren Wassers :

50 % iges  $D_2O$  erhöht bei *Campanula* - Arten die Widerstandsfähigkeit der Blattepidermiszellen gegen Hitze. Ebenso sind japanische B - Enzephalitisviren, gezüchtet in Hühnerembryonalzellen, in Schwerem Wasser hitzestabiler als in  $H_2O$ .

Durch die in Schwerem Wasser auftretende Bildung von starken Deuteriumbrücken wird die Konformation biologischen Materials wie z.B. von Enzymsystemen und Makromolekülen gegen physi-

kalisch-chemische Veränderungen wie z.B. Temperaturerhöhung stabiler als in  $H_2O$  . Auf Grund dieser Stabilisierung können lebensnotwendige, biochemische Vorgänge länger aufrecht erhalten werden.  $D_2O$ -Fische zeigen deshalb auch eine größere Widerstandskraft gegen Hitze als vergleichbare  $H_2O$ -Fische.

In der Kälte dagegen muß man davon ausgehen, daß durch den physikalischen Vorgang der Unterkühlung diese biologischen Systeme nicht mehr in der Lage sind, die zum "Leben" dringend benötigte Energie zu produzieren. Daher können gewisse Strukturen, wie z.B. Konzentrationsgradienten etc. , im Fischorganismus nicht mehr aufrecht erhalten werden, und es kommt zu einer Blockierung vieler biochemischer Vorgänge. In  $D_2O$  dagegen erfolgt - so meinen wir - die Beeinflussung der biologischen Systeme durch Hypothermie aufgrund der Deuteriumbrücken nicht so schnell wie in  $H_2O$  . Dadurch können  $D_2O$  - Fische unter diesen Verhältnissen auch besser leben als die Kontrollen in normalem Wasser !

Vielleicht wäre es denkbar, diesen Schutzeffekt des Schweren Wassers gegen äußere Einflüsse auszunutzen: z.B. bei Operationen oder Organtransplantationen, die einer Unterkühlung des gesamten Körpers bedürfen (110). Auch GOETZE (113,146) erzielte durch lokale homogene Hyperthermie der Gliedmaßen mit Hilfe eines Wasserbades beim Menschen therapeutische Erfolge bei chronischen Gelenkentzündungen.

Somit würde vielleicht auch der Gesamtorganismus - ähnlich wie bei den Fischen - diese extremen äußeren Verhältnisse besser und leichter überstehen können , wenn er vorher durch Schweres Wasser stabilisiert worden ist !?

Daß die angestrebten Endziele noch eine Vielzahl von anderen physiologisch - biochemischen Fragenkomplexe aufwerfen muß, die vor einer erfolgreichen Durchführung weitestgehend geklärt werden müssen, steht wohl außer Frage !

Eins der Hauptprobleme muß sein : wie kann man das Zellwasser der Versuchsobjekte in vivo in kurzer Zeit so mit  $D_2O$  anreichern, daß der Schutzeffekt sich bemerkbar macht ? Wo liegt dabei dann die toxische Grenze für dieses Medium ?

Es darf auf keinen Fall vergessen werden, daß der Körperwasseraustausch gegen Schweres Wasser nur bei den von uns verwendeten Fischen so schnell und einfach möglich war !!

### 2.3.3. Hemmung einer Pharmakonwirkung durch Schweres Wasser

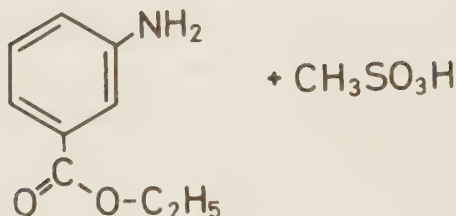
Fische, die in Schwerem Wasser gehalten werden, lernen und behalten nach LEHR et al. (109) eine visuelle Unterscheidungsaufgabe besser als Kontrolltiere in normalem Wasser. Vermutlich werden durch die Ausbildung von Deuteriumbrücken denkbare Speichersubstrate in vivo stabilisiert und damit das Vergessen hinausgezögert. Die Verlangsamung des Fischstoffwechsels (109,115) in  $D_2O$  deutet darauf hin, daß durch die in diesem Medium auftretenden Isotopeneffekte sehr viele Enzymaktivitäten geschwächt werden (66 -78,116,117). Auch die Reaktionsfähigkeit der Muskeln als auch die Reizübertragung der Nerven werden durch  $D_2O$  - Einwirkung erheblich verändert (119 - 121). Ebenso verändern sich in Schwerem Wasser Membranpotentiale von Nerven - und Cerebralzellen (121,122).

#### 2.3.3.1. Metacainnarkose bei Fischen

Diese in  $D_2O$  gefundenen Effekte nahmen wir zum Anlaß, um bei Fischen (Black Mollies) zu testen, ob eventuell die Wirkung eines Pharmakons auf das Zentralnervensystem durch  $D_2O$  beeinflußt werden kann !

Aus der Literatur (123-126) ist bekannt, daß die Substanz "MS - 222 " Sandoz, Nürnberg, (m - Amino - benzoessäureäthylester als Methansulfonat = " Metacain<sup>R</sup> " ) ein gut verträgliches und schnell wirksames Narkosemittel für Fische ist. Kleine und große Fische werden nach Zugabe des Pharmakons oder durch Besprühen der Kiemen mit diesem Narkotikum in kurzer Zeit besinnungslos ( 127 ).

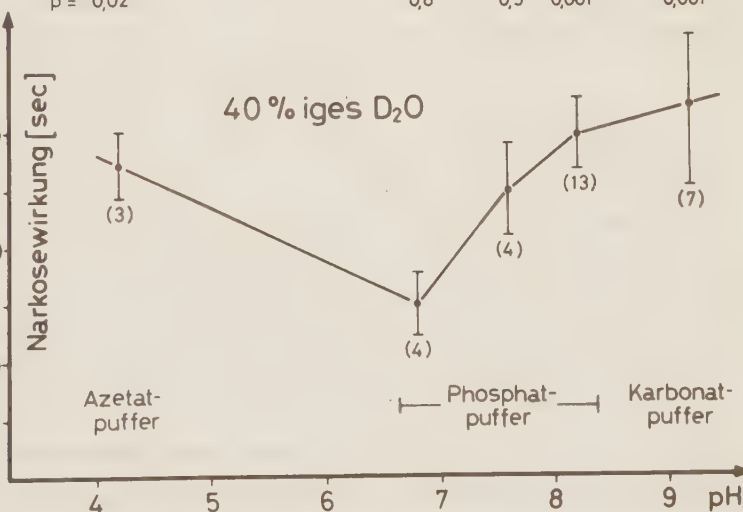
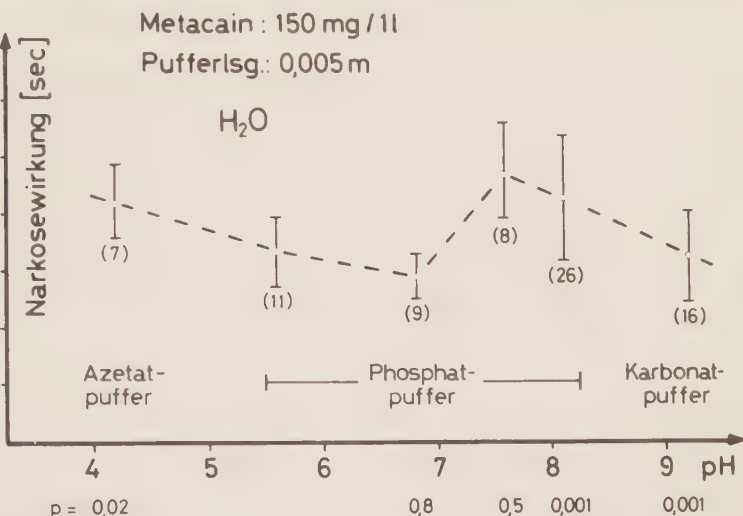
Metacain<sup>®</sup>:



Die bewegungslosen Fische zeigen nach Überführung in ein anderes, mit frischem Wasser gefülltes Becken schnell wieder normales Verhalten. Voraussetzung dafür ist aber, daß die Versuchstemperatur konstant (128) und auch die Luftzufuhr gleichmäßig gehalten werden (129). Verschiedene Autoren konnten feststellen, daß der Sauerstoffverbrauch der Versuchstiere nach Narkoseende innerhalb von ca. 12 - 24 Stunden wieder normalisiert ist (127).

Wir untersuchten den Narkoseeffekt von "MS - 222 - Sanoz " bei Black Mollies erst einmal in normalem Wasser (0,005 m Phosphatpuffer , pH 7,6 ), um für die verwendeten Fische die geeignete und richtige Dosierung des Pharmakons zu ermitteln. Wir stellten fest, daß mit steigender Konzentration an "Metacain" (100 - 200 mg / l ) die Zeiten bis zum Eintritt der Narkose immer kürzer wurden (vergl. Abb. 12 ).

# Narkosewirkung von Metacain bei Fischen in Abhängigkeit vom pH



Die Fische wurden in  $H_2O$  - bzw. 40 % igen  $D_2O$  - Puffer - Lösungen ( 0,005 m von verschiedenen pH - Werten ) bei konstanter Metacainkonzentration ( 150 mg / l ) narkotisiert.

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen ! p gibt die Signifikanzen zwischen den beiden Medien für jeweils einen pH - Wert an ( T - Test ).

Für 20 % ige bzw. 30 % ige  $D_2O$  - Puffer ( pH = 8,2 ) wurden folgende Narkosezeiten erreicht :

315 sec  $\pm$  64 ( n = 5 ) und 301 sec  $\pm$  24 ( n = 8 )

Bei intakter Kiemenatmung lagen die Fische bewegungslos auf dem Boden des Beckens auf der Seite oder auf dem Rücken. Jetzt wurden die Black Mollies kurzfristig mit einem kleinen Löffel aus dem Wasser herausgenommen. Dadurch war es möglich, den Zeitpunkt des Narkosebeginns genau zu bestimmen. Denn sobald die Fische wirklich narkotisiert waren, zeigten sie auch außerhalb der Flüssigkeit keine Bewegungen mehr und blieben gänzlich ruhig liegen !

Welchen Einfluß hat nun 40% iges Schweres Wasser auf die Wirkung dieser chemischen Noxe - "Metacain" bei PH 7,6 ? Die Black Mollies wurden nach einer gewissen Gewöhnungszeit an das neue Medium ( ca. 1 - 2 Std ) in das Aquariumbecken, gefüllt mit D<sub>2</sub>O (pH = 7,6 , Metacainkonzentration 100 - 200 mg / l ) überführt. Auch hier zeigte sich, daß die Zeiten des Narkoseeintrittes mit steigender MS - 222 - Konzentration im Becken immer kürzer wurden. Darüber hinaus stellten wir aber fest, daß sich die Zeiten in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O nicht signifikant unterschieden ( vergl. Abb. Nr. 12 ) ! Die D<sub>2</sub>O - Fische haben ihr Körperwasser vorher gegen Schweres Wasser ausgetauscht. Obwohl nach Ergebnissen anderer Autoren ( 66 - 78, 109, 116, 117, 119 - 122 ) dieser Austausch in vivo hemmende Einflüsse auf den Gesamtorganismus hat, fanden wir gegen die Narkosewirkung des Pharmakons Metacain bei den von uns gewählten Bedingungen keinen meßbaren Effekt in Schwerem Wasser !

Wäre es vielleicht denkbar, daß Fische in  $D_2O$  bei vom Neutralpunkt abweichenden pH - Werten ein anderes Narkoseverhalten zeigen als Kontrolltiere in  $H_2O$  ?

In diesem Zusammenhang möchte ich auf Arbeiten von SIMON et al. (162), DANIELS et al. (163), ALBERT (164), RAHM et al. (165), RICHARDSON et al. (166), GROS (167) und SOLLMANN (168) hinweisen, die untersuchten, ob das nicht ionisierte Molekül oder die ionisierte Form für die Wirkung von Pharmaka verantwortlich ist. Danach sollen schwache Säuren oder Basen als undissoziierte Moleküle die Zellmembran durchdringen und wirken. Dank ihrer großen Lipoidlöslichkeit überwinden sie die Zellmembranen und gelangen dann in das Zellinnere. Dagegen sind Ionen dazu nicht in der Lage ! Somit müssen vor allen Dingen undissoziierte Wirkstoffmoleküle vorliegen, um eine maximale biologische Wirkung erreichen zu können.

Kann man die oben aufgeführten Ergebnisse anderer Autoren auch auf unsere Verhältnisse bei der "Metacain" - Narkose von Fischen übertragen ? Zeigen sich durch Änderungen der pH - Bereiche der Aquariumlösungen und dadurch bedingte Verschiebungen der Ladungsverhältnisse innerhalb des Moleküls " MS - 222 " unterschiedliche Wirkungen bei den Fischen ?

Um diese Fragen beantworten zu können, narkotisierten wir die Fische in 0,005 m Puffersystemen (pH - Werte von 4,2 - 9,2 ) bei konstanter Metacainkonzentration (150 mg / l) in normalem bzw. 40 %igem Schweren Wasser (Abb. Nr. 12 ) .

Beim Vergleich dieser Narkosezeiten über den gesamten pH - Bereich ist auffällig, daß von pH 4,2 bis 7,6 kein unterschiedliches Verhalten der Versuchstiere in beiden Medien festzustellen ist. Bei pH 8,2 und 9,2 dagegen sind die Zeiten bis zur Narkose in  $D_2O$  gegenüber denen in  $H_2O$  signifikant erhöht !

Dieser Effekt des Schweren Wassers auf die Fische zeigt sich deutlich an Hand des errechneten  $D_2O$  - Schutzeffektes Q in der Abb. Nr. 13 und den errechneten p - Werten (T - Test) für diese beiden pH - Mischungen (Q = Narkosezeit in  $D_2O$  in sec. dividiert durch die Narkosezeit in  $H_2O$  in sec.) !

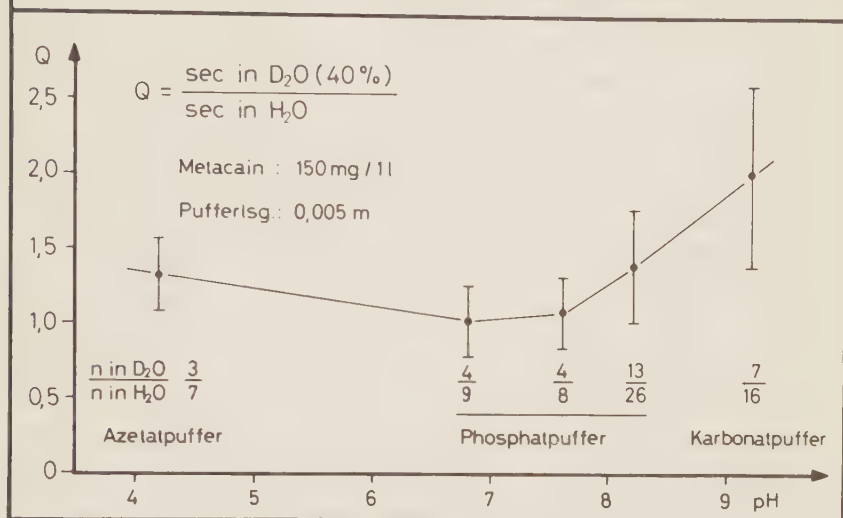
Analogversuche in 20 und 30 prozentigen  $D_2O$  - Pufferlösungen ( 0,005 m Phosphatpuffer, pH 8,2) ergaben vergleichbare Narkosezeiten wie in 40 prozentigem  $D_2O$  (Metacain - Konzentration nur 150 mg / l ); n = 5 und 8. (vergleiche Abb. Nr. 13 ).

Darüber hinaus verfolgten wir noch die Narkosewirkung bei pH = 8,2 in  $H_2O$  und 40 %igem  $D_2O$  über einen größeren Konzentrationsbereich des Pharmakons, d. h. bei einem pH - Wert, in dem sich der  $D_2O$  - Schutzeffekt bemerkbar macht.

Wir stellten fest, daß durch einen Zusatz von  $D_2O$  zum Aquari-  
umwasser die Narkosewirkung gegenüber der in  $H_2O$  über den gesamten Konzentrationsbereich signifikant verzögert wird. (vergleiche Abb. Nr. 14 ).

Abb. Nr. 13

## Metacain-Narkose von Fischen



### D<sub>2</sub>O - Schutzeffekt Q bei der Metacain - Narkose von Fischen

Die Zeiten des Narkoseeintrittes in H<sub>2</sub>O - bzw. 40 % igen D<sub>2</sub>O - Pufferlösungen ( 0,005 m , pH = 4,2 bis 9,2 ) wurden verglichen und der Schutzeffekt Q ermittelt. (vergl. Abb.Nr.12)

Aufgetragen wurden Mittelwerte von Q mit Standardabweichungen für die in beiden Medien benutzte Anzahl n .

Die Signifikanz des Unterschiedes von Q für die pH - Werte von 8,2 bzw. 9,2 zu dem Q - Wert bei pH 7,6 beträgt :

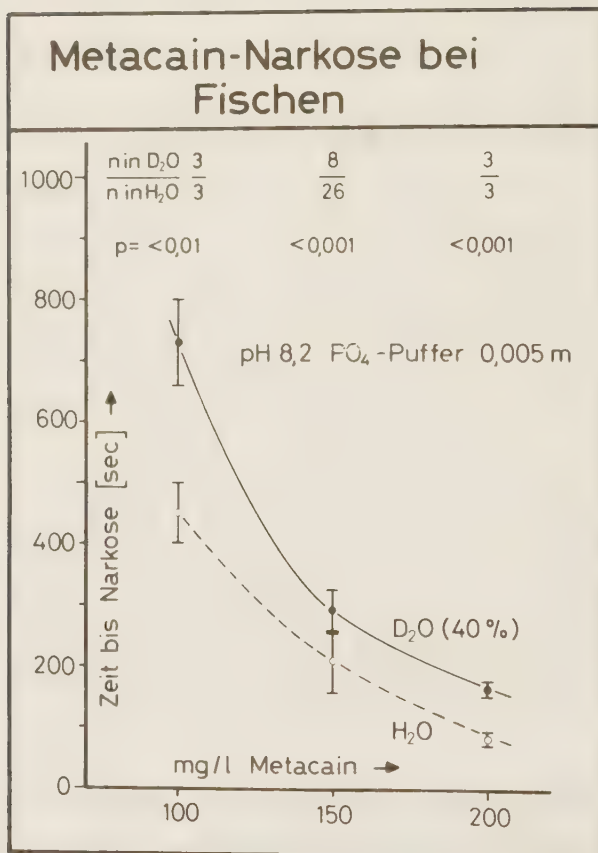
$$p = 0,06 \quad \text{und} \quad p < 0,01 \quad (T - \text{Test})$$

( für n = 8 / 13 )                      ( für n = 8 / 7 )

Für 20 % igen bzw. 30 % igen D<sub>2</sub>O - Puffer ( pH = 8,2 ) wurden folgende Q - Werte errechnet :

$$\begin{aligned}
 1,480 \pm 0,476 & \quad (20 \% \text{ iges D}_2\text{O}) \\
 1,415 \pm 0,387 & \quad (30 \% \text{ iges D}_2\text{O}) \\
 1,385 \pm 0,379 & \quad (40 \% \text{ iges D}_2\text{O als Vergl.})
 \end{aligned}$$

Abb. Nr. 14



#### Metacain - Narkose bei Fischen in $H_2O$ und $D_2O$

Die Fische wurden in Becken mit  $H_2O$  bzw. 40 % igem  $D_2O$  ( 0,005 m Phosphatpuffer pH = 8,2 ) gehalten und zum jeweiligen Versuch in das Narkosebecken von gleichem pH - Wert überführt .

#### Ordinate :

Dauer vom Einsetzen der Fische in das Narkosebecken bis zum Beginn der Narkose ( sec. ) .

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen  
p gibt die Werte der Signifikanzen zwischen den beiden Medien für jeweils eine Metacain - onzentration an !

Auf welchen Effekt des Schweren Wassers ist das oben beschriebene, im schwach alkalischen Milieu auftretende Phänomen der Narkoseverzögerung bei Fischen vielleicht zurückführbar ? Wir stellten die Hypothese auf, daß - wie allgemein angenommen - die Stabilität der Konformation von Polynukleotiden, Proteinen und Zellmembransystemen im Wesentlichen durch das Vorhandensein der Wasserstoffbrückenbindungen im Organismus bestimmt wird. Da nach Untersuchungen anderer Autoren (17 - 20; 79) die Deuteriumbrücken bedeutend stabiler sind als entsprechende Wasserstoffbrücken, kann man sich denken, daß nach Substitution von Wasserstoff durch Deuterium die Konformation von Makromolekülen verstärkt werden könnte. Durch diese Tatsache müßten dann biologische Strukturen erheblich stabiler gegen chemische und physikalische Noxen werden !

Wenn die oben aufgestellte Hypothese stimmt, könnte man davon ausgehen, daß die Penetration des Metacains durch Zellmembranen erschwert und biochemische Einflüsse dieses Pharmakons auf das Zentralnervensystem als Ort der Wirkung geschwächt werden. Die direkte Folge dieses Stabilisierungsvorganges in  $D_2O$  ist auch die von uns festgestellte Verzögerung des Narkoseeintrittes !

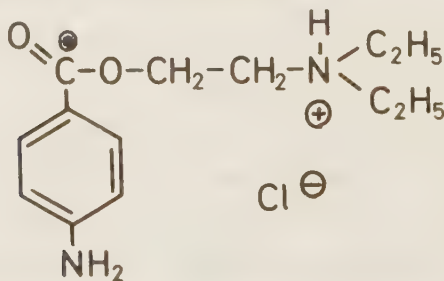
Vielleicht werden aber auch nach verlangsamter Durchdringung des Pharmakons durch das Gewebe der Fische denkbare " Arzneimittelacceptoren " im Gehirn durch  $D_2O$  beeinflusst. Dadurch könnte es sein, daß z.B. eine angebotene Substanz wie

Metacain entweder schlechter gebunden und/oder nach erfolgter Anlagerung an den Rezeptor erheblich schwieriger metabolisiert wird.

### 2.3.3.2. Procainmetabolismus bei Fischen

In D<sub>2</sub>O wird die Metacainnarkose von Fischen im alkalischen Milieu gegenüber Kontrollen in H<sub>2</sub>O gehemmt (Abb. Nr. 12-14). Gibt es vielleicht eine Methode, diesen D<sub>2</sub>O - Hemmeffekt auf die Wirkung von Arzneimitteln in vivo oder in vitro an Hand von Analogversuchen mit <sup>14</sup>C - Procain genauer zu erklären ?

<sup>14</sup>C - Procain HCl<sup>®</sup> :



An dieser Stelle möchte ich auf Arbeiten von SUSINA et al. (131) hinweisen, die die Einflüsse von Schwerem Wasser auf die lokalanästhetische Wirksamkeit von Procain untersucht haben. Die DE<sub>50</sub> (effektive Dosis) wurde nach der Methode von CHANCE und LOBSTEIN bestimmt. In H<sub>2</sub>O betrug die DE<sub>50</sub> 1,8 %, in D<sub>2</sub>O dagegen nur 1,0 %. Ein signifikanter Unterschied in der Toxizität konnte aber nicht festgestellt werden !

Um die oben gestellte Frage (vergl. 2.3.3.2.) eventuell beantworten zu können, gingen wir folgendermaßen vor :

H<sub>2</sub>O- und D<sub>2</sub>O - Fischen wurde ein dem Metacain ähnliches Molekül, das Lokalanästhetikum <sup>14</sup>C - Procainhydrochlorid ( p-Aminobenzoesäureäthylester als salzsaures Salz ) in Lösung angeboten.

Bei gleichmäßiger Luftzufuhr wurden nach verschiedenen Zeiten ( 3 1/2 Minuten bis 4 Stunden ) die Versuchstiere aus der radioaktiven Lösung entnommen, getötet und der Einbau von <sup>14</sup>C - Procain in das Gehirn und in das Gewebe bestimmt.

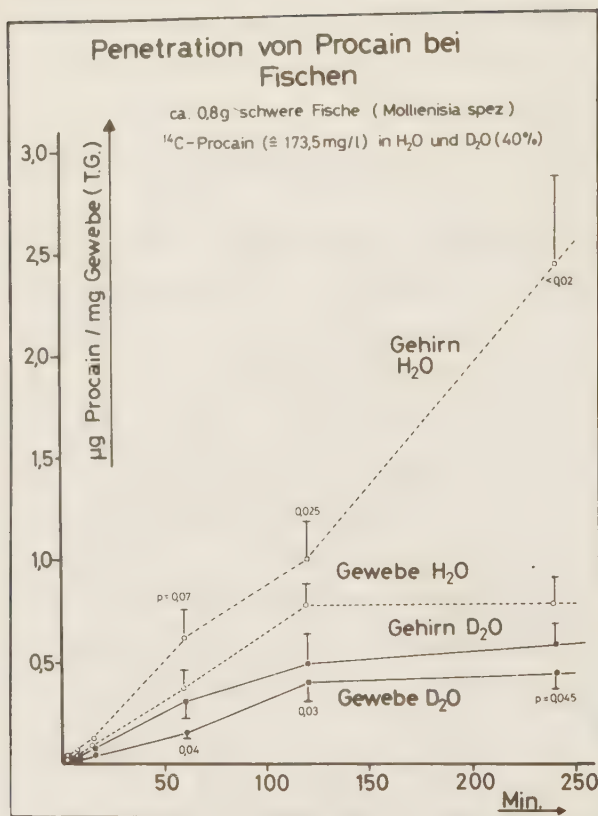
(Methodik s. M 5 ). Wir fanden, daß im Muskel der H<sub>2</sub>O - Fische im Vergleich zu den entsprechenden D<sub>2</sub>O - Tieren mehr Aktivität aufgenommen wurde. Dieser Unterschied wurde erheblich größer im Gehirn ! Während in Schwerem Wasser die Einbauraten nur sehr langsam in Abhängigkeit von der Zeit zunahmen, erreichten sie beim Gehirn in wässriger Lösung über den gesamten Zeitabschnitt steil ansteigende Werte ! (Abb. Nr. 15).

Wir meinen an Hand der ermittelten Ergebnisse des Procain-einbaues darauf schließen zu können, daß sowohl das Gewebe als auch in besonderem Maße das Gehirn der D<sub>2</sub>O - Fische weniger Narkotikum aufnehmen als die Tiere in H<sub>2</sub>O !

Damit kann ein angebotenes Pharmakon wie Procain oder Metacain in Schwerem Wasser weniger und/oder langsamer seine Wirkung entfalten als in normalem Wasser.

Zu diesem Verzögerungseffekt käme eventuell noch eine Stabilisierung von "Arzneimittelacceptoren ". Diese könnten durch die in D<sub>2</sub>O auftretende Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit und durch stärkere Brückenbildung in ihrer Kon-

Abb. Nr. 15



Einbausraten von  $^{14}\text{C}$  - Procain in das Gewebe und in das Gehirn von Fischen in  $\text{H}_2\text{O}$  und 40 % igem  $\text{D}_2\text{O}$  .

Nach verschiedenen Zeiten ( 3 1/2 bis 240 Min. ) wurden die Fische aus den Becken herausgenommen , und nach Auf - arbeitung die inkorporierte Menge an  $^{14}\text{C}$  - Procain be - stimmt .

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 4$  .

$p$  gibt die Signifikanz der Unterschiede zwischen dem jeweiligen Einbau in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  an ( T - Test ) .

$\text{pH}$  - Wert der Lösungen ca. 7,5

formation verändert werden. Dies hätte unmittelbar zur Folge, daß sowohl die Bindung als auch die anschließende Metabolisierung eines Pharmakons gehemmt und verzögert würden !

Im menschlichen als auch tierischen Organismus wird Procain schnell durch im Körper vorhandene "Esterasen" in zwei Produkte gespalten : Diäthylaminoäthanol und p - Aminobenzoessäure (132 - 143 ).

Mit dem folgenden Versuch wollten wir herausfinden, ob durch Fischgewebe das verwendete Pharmakon "Procain" in 40% igem Schweren Wasser in einer anderen Art und Weise metabolisiert wird als in normalem Wasser . Liegt vielleicht darin der Hauptgrund dafür, daß die "Metacain" - Narkose bei Fischen in  $D_2O$  im alkalischen Milieu verzögert wird ?

Das von uns ausgewählte, dem Metacain sehr ähnlich aufgebaute Arzneimittel "Procain" ist in der Carboxylgruppe  $^{14}C$  markiert. Bei der Inkubation mit Fischhomogenat bei  $37^{\circ}C$  wird es gespalten; nach anschließender Extraktion und Aufarbeitung können die entstandenen Metabolite unter Verwendung des " Scanners " durch DC - nachweisbare Substanzen identifiziert werden : p - Aminobenzoessäure und deren weitere Abbauprodukte ( entstanden durch Hydroxylierung und durch denkbare Acetylierung (vergl. 23) ).

Ebenfalls gebildeter Diäthylaminoäthanol kann mit dieser von uns angewendeten Methode nicht nachgewiesen werden, da dieser nicht radioaktiv

markiert ist ! (Methodik s. M 6 ).

Als Kontrollwerte werden in  $H_2O$  als auch in  $D_2O$  jeweils Vergleichswerte in Eis inkubiert, um eventuelle Zersetzungsprodukte des Procains durch das Fischhomogenat selbst ausschließen zu können .

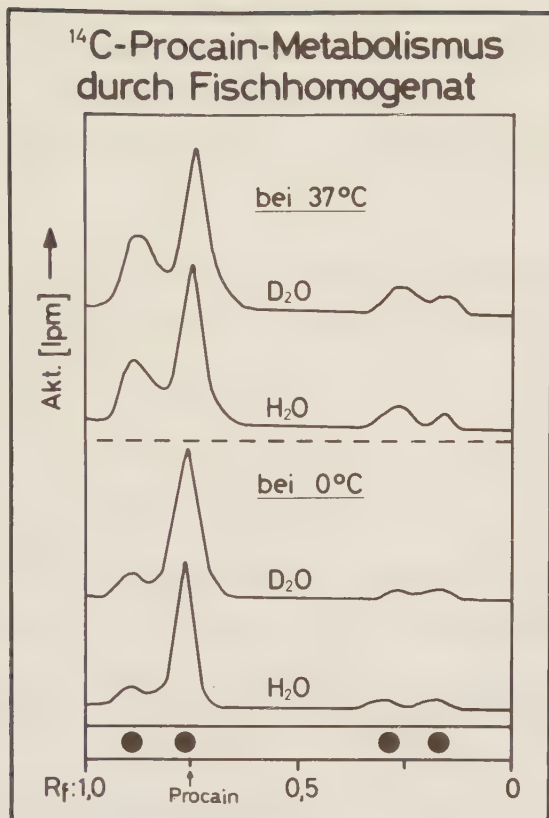
Durch Vergleich der RF - Werte mit denen der Referenzsubstanzen kann man folgendes sagen ( Abb. Nr. 16 ) :

Neben der freien, nicht umgesetzten Procainbase entstehen bei der Inkubation noch drei andere, radioaktiv markierte Spaltprodukte. Die beiden unteren Metabolite ( RF - Werte : 0,173 und 0,280 ) stimmen mit den Vergleichssubstanzen überein und reagieren ebenfalls mit " Ehrlich's Reagenz ". Daher kann man annehmen, daß es sich hierbei um p - Aminobenzoessäure und p - Aminosalicylsäure handelt. Bei dem oberen, dritten Abbauprodukt könnte man sagen, daß es ein N - Acetylderivat des Procains ist ( 23 ). Denn es reagiert nicht mehr mit " Ehrlich's Reagenz " und hat in dem Fließmittel einen größeren RF - Wert als die Ausgangssubstanz ! ( RF - Wert : 0,890 ; RF - Wert von Procainbase : 0,760 ) ( 23,138 )

Durch DC ist somit eindeutig feststellbar, daß die Metabolisierung des Pharmakons nach erfolgter Inkubation mit Fischhomogenat in beiden Medien identisch ist ! (Methodik s. M 6 ). Die Verzögerung der Narkosewirkung in  $D_2O$  ist also nicht in einem unterschiedlichen Abbauweg des Arzneimittels in normalem und Schwerem Wasser begründet !

Im Aquariumwasser ( in  $H_2O$  als auch in  $D_2O$  ) selbst konnten

Abb. Nr. 16



Metabolisierung von  $^{14}\text{C}$  - Procain nach 40 - minütiger  
in vitro - Inkubation mit Fischhomogenat bei 0 °C und  
37 °C in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  .

Procain - Konzentration : 110  $\mu\text{g}$  / 3 ml Ansatz

Inkubationsmedium:  $\text{H}_2\text{O}$  - und  $\text{D}_2\text{O}$  ( 40 % ig ) - Krebs -  
Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4

Fließmittel : erst I , dann II

I.: Benzol/  $\text{HCOOC}_2\text{H}_5$  /  $\text{HCOOH}$  75 : 24 : 1

II.: Toluol / Xylol / Dioxan / Isopropanol /  $\text{NH}_3$  ( konz. )  
10 / 10 / 30 / 30 / 20

Rf. - Werte : 0,173 = PAB

0,280 = PAS

0,760 = Procain

0,890 = N - Acetyl -  
Procain

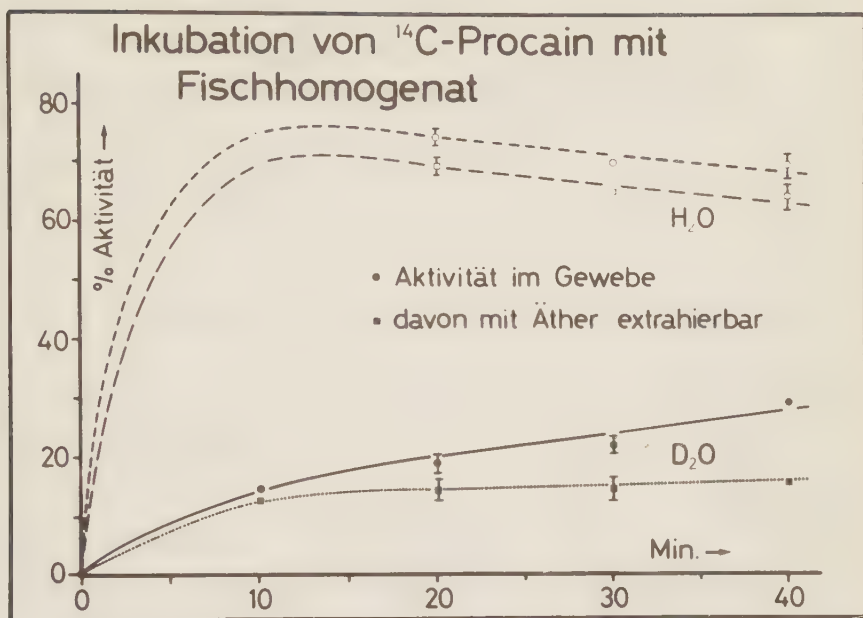
wir bei den in vivo - Versuchen mit  $^{14}\text{C}$  - Procain (Abb. 15 ) auch nach vier Stunden durch DC keine Spaltprodukte des Procains nachweisen. Daher kann man wohl davon ausgehen, daß Fische in vivo in beiden Medien innerhalb dieser Zeitspanne keine Metabolite ausscheiden und an das sie umgebende Wasser abgeben.

Dennoch zeigte sich bei der durchgeführten Bilanz der wiedergefundenen Procainaktivität nach der Inkubation mit Fischhomonat (vergl. Abb. 17 und 18 ) ein, unsere Theorie der Stabilisierung biologischer Systeme durch Schweres Wasser unterstützendes Ergebnis: im Inkubationsüberstand war in  $\text{D}_2\text{O}$  ca. 3mal mehr Aktivität wiederzufinden als in  $\text{H}_2\text{O}$ . Hieraus läßt sich ableiten, daß in Schwerem Wasser ein angebotenes Arzneimittel wie "Procain " oder "Metacain" vom Organismus entschieden langsamer aufgenommen werden kann (Abb. Nr. 18 ). Einmal vom Gewebe resorbiertes Procain dagegen wird in  $\text{D}_2\text{O}$  ca. 4 - 5 mal fester gebunden als in wässriger Lösung. Folglich ist es auch verständlich, daß nicht ausschüttelbares, ins Gewebe eingebautes Procain in  $\text{D}_2\text{O}$  ca. 3 - 4 mal mehr zu finden ist als in  $\text{H}_2\text{O}$  (Abb. Nr. 17) .

Für die oben erwähnten Ergebnisse ist folgende Deutung diskutierbar:

In Schwerem Wasser kommt es tatsächlich - analog unserer Hypothese - durch die Ausbildung von Deuteriumbrücken bei biologischen Strukturen zu einer erheblichen Stabilisierung; Polynukleotide, Proteine, Zellmembranen und vielleicht auch denkbare "Arzneimittelacceptoren" werden durch die Deuterierung

Abb. Nr. 17



In vitro - Inkubation von  $^{14}\text{C}$  - Procain mit Fischhomogenat bei 37 °C in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  .

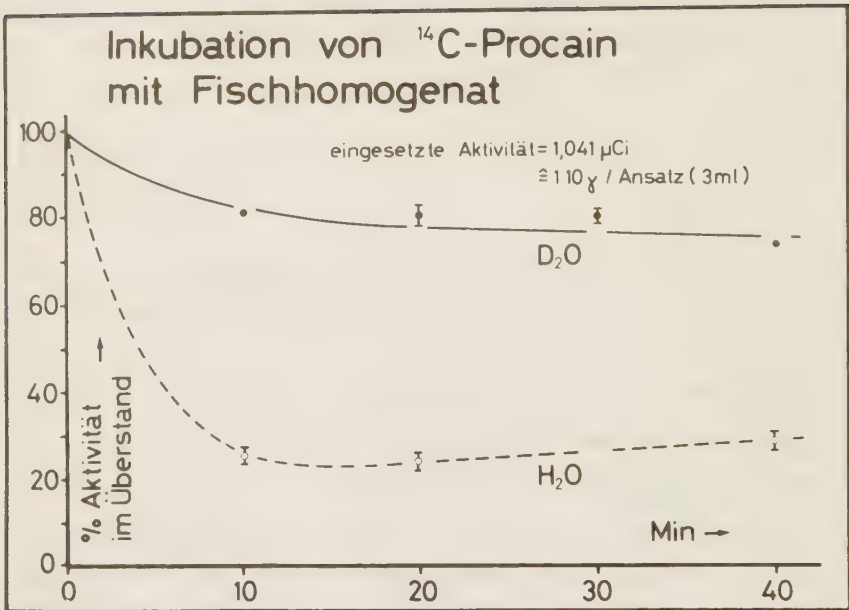
$^{14}\text{C}$  - Procain wurde in der angegebenen Konzentration von 110  $\gamma$ /3ml mit Fischhomogenat in  $\text{H}_2\text{O}$  bzw. 40 % igem  $\text{D}_2\text{O}$  - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , ph = 7,4 , verschieden lang bei 37 °C im Schüttelthermostat erwärmt .

Der jeweilige Kurvenverlauf spiegelt die Einbauraten des Pharmakons in das Fischhomogenat in beiden Medien wider ; ebenso den Anteil des Arzneimittels , der nach der Inkubation aus dem Homogenat mit Äther extrahierbar ist .

Die nach der Inkubation wiedergefundene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Vergleiche Methodik M 6 .

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 2$  . Die Meßpunkte ohne Standardabweichungen gelten für  $n = 1$  , da die Verbrennung des Homogenates in diesen Fällen jeweils nur bei 1 Probe quantitativ verlaufen war .

Abb. Nr. 18



In vitro - Inkubation von  $^{14}\text{C}$  - Procain mit Fischhomogenat  
bei 37 °C in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  .

$^{14}\text{C}$  - Procain wurde in der angegebenen Konzentration von  $110 \gamma / 3 \text{ ml}$  mit Fischhomogenat in  $\text{H}_2\text{O}$  bzw. 40 % igen  $\text{D}_2\text{O}$ - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH  $\approx 7,4$  , ver - schieden lang bei 37 °C im Schüttelthermostat erwärmt .

Der jeweilige Kurvenverlauf spiegelt die nach Inkubation im Überstand verbliebenen Aktivitätsverhältnisse wider .

Die nach Inkubation wiedergefundene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt . Vergleiche Methodik M 6 .

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 2$  . Die Meßpunkte ohne Standardabweichungen gelten für  $n = 1$  , da in diesen Fällen jeweils nur bei einer Probe die  $^{14}\text{C}$  - Aktivitätsmessungen möglich waren .

in Schwerem Wasser in ihrer Konformation gefestigt und somit auch in ihrer physiologischen Wirkung in vivo stark beeinträchtigt !

Aus diesem Grunde ist es auch möglich, daß der Einfluß eines Pharmakons auf das Zentralnervensystem, wie z.B. der des Metacains, in diesem Medium bei Fischen unter gewissen Versuchsbedingungen gehemmt wird.

#### 2.3.3.3. Resorptionshemmung von HTO bei Fischen durch D<sub>2</sub>O

Den bereits erwähnten nachweisbar verlangsamten Stoffwechsel bei Fischen (105,107,108,109,115) durch D<sub>2</sub>O wollten wir durch eine weitere Versuchsreihe in vivo bestätigen. Die zugrunde liegende Fragestellung war:

Welchen Einfluß haben verschiedene D<sub>2</sub>O - Konzentrationen ( 5 - 40 % ) auf den Fischorganismus bei der Resorption eines einfachen Moleküls wie HTO ?

Die eigentliche Meßreihe wurde jedoch nicht beim Resorptionsvorgang (HTO ins Körperinnere der Fische) , sondern beim umgekehrten Vorgang (HTO aus dem Körperinneren ins Aquariumwasser ) durchgeführt. Denn es ist leichter, das Ansteigen der Radioaktivität, beginnend bei einem niedrigen Niveau zu messen, als die Aktivitätsabnahme bei einem hohen Aktivitätsspiegel zu verfolgen ! Da die Elimination von HTO der vorhergehenden Resorption von HTO bei konstanten Versuchsbedingungen entspricht, kann diese Technik auch für Resorptionsstudien verwendet werden ! (vergl. Methodik M 7 )

Wir ließen ca. 1,0 g schwere Fische (*Mollie-*  
*nisia spec.*) in einer Mischung von HTO und  
Aquariumwasser ( = 0 %  $D_2O$  ) bei 25 °C 180 Min.  
bzw. 24 Std. lang unter ständiger Luftzufuhr  
schwimmen. Um die Effekte des Schweren Wassers  
dabei untersuchen zu können, wurde den je-  
weiligen Aquariumwassermischungen mit HTO  
Schweres Wasser in bestimmten Mengenverhält-  
nissen zugesetzt ( 5- 40 %  $D_2O$  ), Wie bei den  
anderen in vivo - Versuchen mit diesen Tieren  
wurden die Fische ca. 1 - 2 Stunden vorher an  
das neue Medium gewöhnt.

Nach genau drei Stunden bzw. 24 Std. wurden  
dann die Black Mollies aus den verschiedenen  
Aufnahmebecken, gefüllt mit einer Mischung aus  
Aquariumwasser, HTO und  $D_2O$  einer bestimmten  
Konzentration ( 0 - 40 % ), in Austauschbecken  
identischer  $D_2O$  - Konzentration eingebracht.  
Nach bestimmten Zeitabschnitten ( 0 - 240 Min.)  
wurde jeweils ein Aliquot aus dem Austausch-  
becken entnommen und die darin enthaltene Akti-  
vität (HTO) bestimmt ( vergl. Schema S.78)(144).

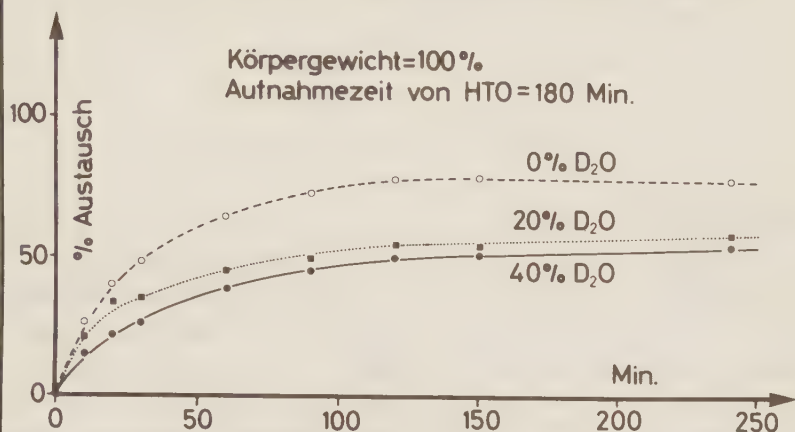
Da die jeweiligen Fischgewichte bekannt waren, konnten wir  
über den gesamten Zeitverlauf die ausgetauschte Menge HTO  
verfolgen und auf das Körpergewicht der Tiere umrechnen.(109).

Aus Abb. Nr. 19 ist zu erkennen, daß in  $H_2O$  nach ca. 90 Min.

Abb. Nr. 19

## Austauschrate des Körperwassers bei Fischen in $D_2O$ und $H_2O$

Körpergewicht=100%  
Aufnahmezeit von HTO=180 Min.



Zeitabhängigkeit des Austausches von Körperwasser bei Fischen mit Aquariumwasser ( 0 %  $D_2O$  ) oder mit Mischungen aus Aquariumwasser mit  $D_2O$  .

Nach 180 Min. wurden jeweils 2 Tiere gemeinsam aus den HTO - Aufnahmebecken herausgenommen und in Becken überführt , in denen Schweres Wasser mit gleicher Konzentration ( 0 , 20 , 40 % ) enthalten war .

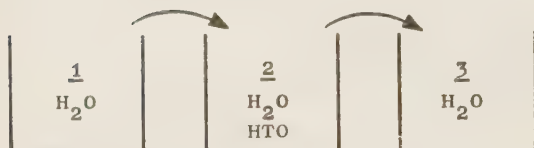
Der jeweilige Kurvenverlauf spiegelt den zeitlichen Rücktausch von HTO - Körperwasser im Abgabebecken wider = Elimination von Tritiumwasser .

Versuchsanordnung vergl. Schema S. 78

# Schema für den Austausch des Körperwassers von Fischen

mit HTO in normalem bzw. Schwerem Wasser

( vergl. Abbildungen Nr. 19 und 2o )



## Versuchsanordnung in H<sub>2</sub>O

Je zwei Fische wurden aus Becken 1 ( 25 °C ) entnommen und für genau 18o Min. bzw. 24 Std. in das aktive Aufnahmebecken 2 ( 25 °C ) überführt. Nach dieser Zeit wurden die Fische gemeinsam in das Abgabebecken 3 ( inaktiv , 25 °C ) gesetzt ; nach o - 24o Min. wurde die von den Tieren eliminierte Aktivität an HTO bestimmt .



## Versuchsanordnung in D<sub>2</sub>O

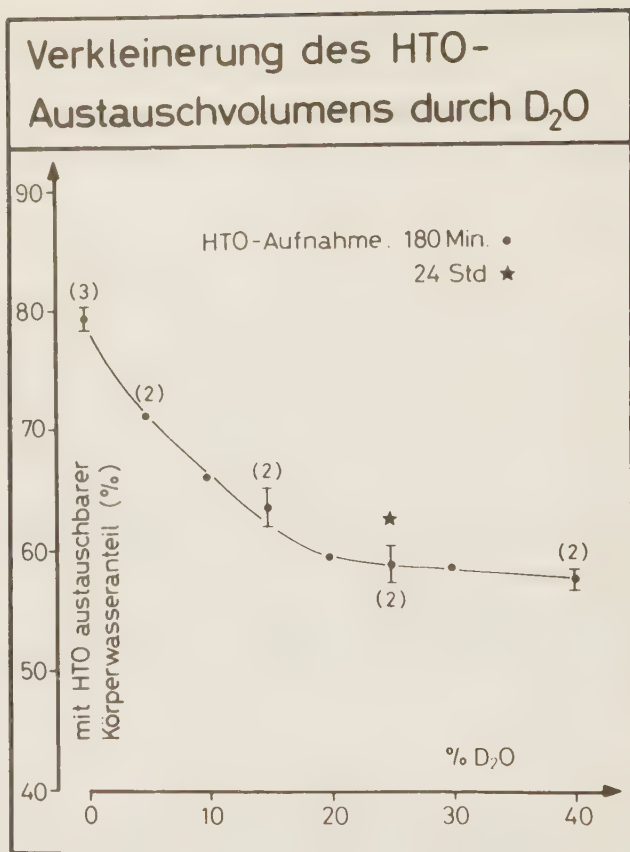
Je zwei Fische wurden gemeinsam aus Becken I ( 25 °C ) entnommen und für ca. 1 - 2 Std. in Becken II an das neue Medium gewöhnt ( 25 °C ) . Danach wurden sie für genau 18o Min. bzw. 24 Stunden in das aktive Aufnahmebecken III ( 25 °C ) überführt . Nach dieser Zeit wurden die zwei Fische wiederum gemeinsam in das inaktive Abgabebecken IV ( 25 °C ) gesetzt ; nach o - 24o Min. wurde die von den Tieren eliminierte Aktivität an HTO bestimmt .

die Fische ungefähr 75 - 80 % ihres Körpergewichtes mit dem sie umgebenden Aquariumwasser ausgetauscht haben. Nach längerer Zeit des Verbleibens im Austauschbecken ändert sich dieser Wert nicht mehr wesentlich ( an der Plateaubildung ersichtlich ) ! Dies ist an sich nicht erklärlich, da wir annehmen müssen, daß ca 90 % des Körpergewichtes bei Fischen aus Wasser besteht. (Eigene Untersuchungen bei der Gefriertrocknung von Black Mollies haben ergeben, daß der Trockenverlust bei ca. 90 % des Körpergewichtes liegt) . Die noch fehlenden ca. 10 Prozent zwischen Austauschrate und Trockenverlust kann man wohl folgendermaßen erklären : Angebotenes HTO wird vom Fischorganismus in seinen Stoffwechsel mit eingebaut ! Dadurch wird das Tritium nicht wieder ausscheidungsfähig und verbleibt im Fischkörper ! Somit kann möglicherweise diese Grenze von ca. 80 % die oberste Austauschrate darstellen ( für die von uns gewählte Methode ) !

In Schwerem Wasser ist eine eindeutige Erniedrigung der Austauschrate zu erkennen. Diese Hemmung wird mit steigender  $D_2O$  - Konzentration größer, um bei 40 % igem Schwerem Wasser einen gewissen Sättigungsgrad zu erreichen! (Abb. Nr. 20 )

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in  $D_2O$  das scheinbare Austauschvolumen des Körperwassers immer geringer wird. HTO ist nicht mehr in der Lage, in das Gewebe der Fische in einem so großen Maße zu penetrieren wie in normalem Wasser ! (Abb. Nr. 21 )

Abb. Nr. 20



Verkleinerung des mit HTO austauschbaren Körperwasser -  
anteils bei Fischen durch Schweres Wasser.

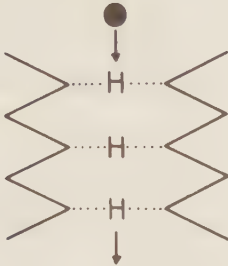
Versuchsanordnung vergleiche Abb. Nr. 19

An Hand der von den Fischen maximal eliminierten HTO -  
Mengen wurde für jede D<sub>2</sub>O - Konzentration ( 0 - 40 % )  
der mit Tritiumwasser austauschbare Körperwasseranteil  
der Tiere berechnet .

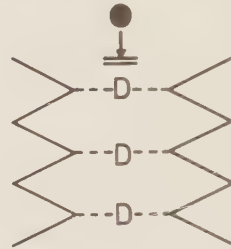
Das jeweilige Körpergewicht der Fische wurde dabei als  
Bezugsgröße 100 % gesetzt !

Abb. Nr. 21

## Erschwerte Penetration eines Moleküls in $D_2O$



Makromolekül  
mit H-Brücken in  $H_2O$



Makromolekül  
mit D-Brücken in  $D_2O$

Wasserstoffbrücken-Festigkeit  
in  $H_2O$  < in  $D_2O$

Durch die Ausbildung von starken Deuteriumbrücken in Schwerem Wasser können sowohl die Syntheseleistungen von Einzelzellen ( Normal - und Tumorgewebe ) als auch der Gesamtorganismus von Fischen vor den schädigenden Einflüssen durch Hypo - und Hyperthermie geschützt werden . Ebenso können daher in  $D_2O$  die Penetration und Elimination als auch die Auswirkungen von verschiedenen Pharmaka bei Fischen gegenüber  $H_2O$  geändert werden !  
( vergleiche Abb. Nr. 3 - 7 , 9 - 15 , 17 - 20 , 22 - 23 )

Wir glauben, daß dies in Folgendem begründet sein könnte: in  $D_2O$  werden vorhandene "Zwischenräume" im Fischgewebe durch Deuteriumbrücken verhältnismäßig stark verkleinert. Daher kann selbst ein hydrophiles Molekül wie HTO dort nicht mehr so leicht eindringen wie in  $H_2O$ . Ist dieser Stoff jedoch vom Körper der Tiere erst einmal resorbiert worden, wird auch die anschließende Eliminierung durch die in  $D_2O$  auftretende Reaktionsgeschwindigkeitsverlangsamung wieder verzögert.

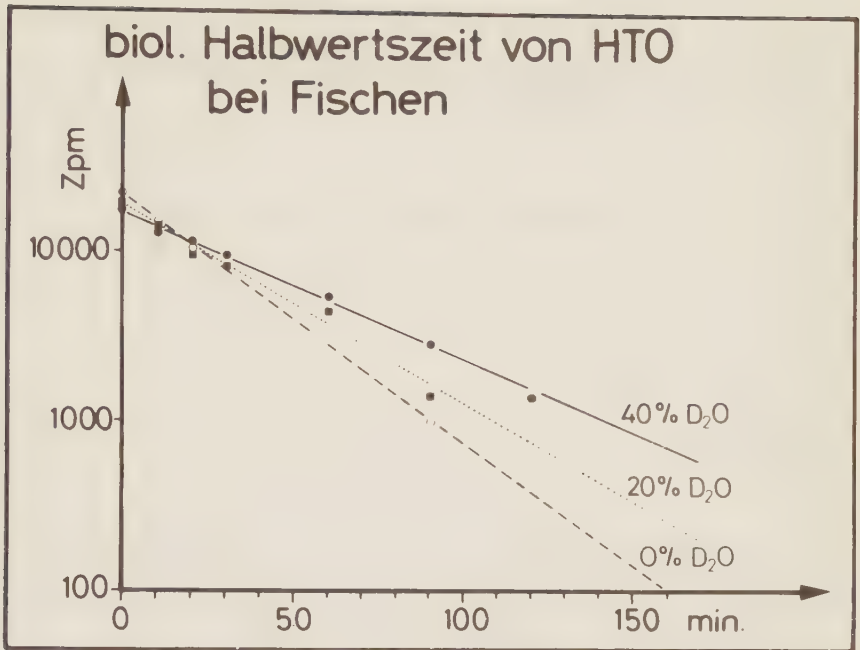
Dieser Hemmeffekt des Schweren Wassers bei der Resorption und der Eliminierung eines Stoffes ( in unserem Falle : HTO ) zeigt sich auch in den ermittelten biologischen "Halbwertszeiten", deren Werte mit steigender  $D_2O$  - Konzentration erheblich größer werden (Abb. Nr. 23 ) .

Wir bezeichnen als biologische Halbwertszeit den Zeitraum ( in Min. ), in dem die Fische 50 % der einmal aufgenommenen HTO - Menge im Abgabebecken wieder eliminiert haben ( Abb. Nr. 22 ). Geschieht dieser Vorgang der Ausscheidung schnell, so ist die HWZ. klein.

#### 2.3.4. Diskussion der Fischversuche

LEHR et al. (109) und HAESER et al. (115) konnten in Schwerem Wasser einen eindeutigen Hemmeffekt auf den Sauerstoffverbrauch und die Nahrungsaufnahme bei Fischen in vivo feststellen. Auch bei denen von uns durchgeführten Versuchen zeigte sich, daß sowohl die Resorption als auch die an-

Abb. Nr. 22



Halblogarithmische Darstellung des Austausches von  
Körperwasser bei Fischen mit Aquariumwasser ( 0 % D<sub>2</sub>O )  
oder mit Mischungen aus Aquariumwasser mit D<sub>2</sub>O .

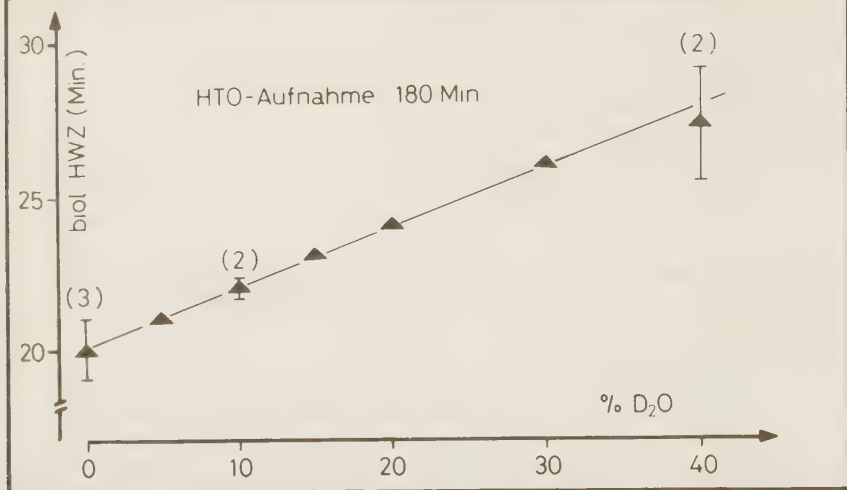
Nach 180 Min. wurden die Tiere aus den HTO - Aufnahme -  
becken herausgenommen , in denen ebenfalls Schweres  
Wasser mit gleicher Konzentration enthalten war .

Der jeweilige Kurvenverlauf spiegelt den zeitlichen  
Rücktausch von HTO - Körperwasser im Abgabebecken  
wider = Elimination von Tritiumwasser

Versuchsanordnung vergleiche Abb. Nr. 19

Abb. Nr. 23

## biol. Halbwertszeit von HTO bei Fischen bei verschiedener $D_2O$ Konzentration



Abhängigkeit der " biologischen Halbwertszeit " von HTO bei Fischen von verschiedenen  $D_2O$  - Konzentrationen.

Versuchsanordnung vergleiche Abb. Nr. 19 und 22

Für jede  $D_2O$  - Konzentration ( 0 - 40 % ) wurde an Hand der halblogarithmischen Darstellung des Austausches von Körperwasser bei Fischen ( *Mollienisia spec.* ) mit Mischungen von HTO / Aquariumwasser /  $D_2O$  der jeweiligen Konzentration die biologische Halbwertszeit ( HWZ ) bestimmt .

Das ist die Zeit , nach der die Fische die Hälfte des im Körper aufgenommenen Tritiumwassers wieder eliminiert haben.

n gibt für die betreffende  $D_2O$  - Konzentration die Anzahl der Versuche an . Dabei wurden Mittelwerte mit Standard - abweichungen aufgetragen .

schließende Elimination von Pharmaka (Metacain, Procain und auch von HTO ) in diesem Medium erheblich verlangsamt werden. Wir glauben, daß in  $D_2O$  durch Deuteriumbrückenbildung Zellmembranen oder auch Grenzflächen in ihrer Konformation starrer und somit weniger permeabel für diese Stoffe werden.

Dazu zählen wir auch noch etwa vorhandene " Arzneimittelacceptoren " im Gehirn der Fische, die durch die Deuterierung sowohl den Angriff eines Pharmakons als auch nach erfolgter Bindung die anschließende Metabolisierung erschweren könnten (vergl. Inhibierung der Metacainnarkose und verzögerte Freigabe von Procain und von HTO ).

(Abb. Nr. 12,13,15,17 - 20,22 und 23 )

In diesem Zusammenhang möchte ich auf Untersuchungen von LENDLE und MOHRMANN (169,170) über allgemeine Diffusionsgeschwindigkeiten und Austauschreaktionen narkotisch wirksamer Stoffe bei Fischen hinweisen.

Dieser  $D_2O$  - Stabilisierungseffekt auf biologische Strukturen ist auch gut bei Bedingungen feststellbar, denen Fische normalerweise in der Natur nicht ausgesetzt werden, wie z.B. Hypo- und Hyperthermie. Solche unphysiologischen Verhältnisse werden von  $D_2O$  - Fischen nachweislich besser vertragen als von Kontrollen in  $H_2O$  (Abb. Nr. 9 - 11) .

BROOM (110) konnte in  $H_2O$  durch Unterkühlung des lebenden Organismus über große Heilungserfolge bei Operationen oder Organtransplantationen berichten. Es wäre denkbar,

derartige Versuche auch in  $D_2O$  durchzuführen, um somit den von anderen Autoren und von uns nachgewiesenen Stabilisierungseffekt auf biologische Strukturen für eine erfolgreichere Behandlung auszunützen.

GOETZE und auch andere Wissenschaftler (113,145 - 156) versuchten mit mehr oder weniger großem Erfolg durch homogene Hyperthermie der Gliedmaßen und des Körpers - besonders bei Tumorbefall - in vivo therapeutische Erfolge zu erzielen. Auch unter derartigen Versuchsbedingungen könnte man in  $D_2O$  eventuell größere Erfolge erzielen, wie unsere Fischuntersuchungen gezeigt haben.

Es ist natürlich evident, daß es nur bei den von uns verwendeten Fischen so einfach ist, das gesamte Körperwasser in einer sehr kurzen Zeit durch  $D_2O$  in vivo in einer verhältnismäßig hohen Konzentration zu ersetzen. Bei anderen Versuchstieren wären vor Beginn ähnlicher Untersuchungen längere Gewöhnungszeiten an das neue Medium unerlässlich ! Dazu muß noch gesagt werden, daß bei höheren Tieren die  $D_2O$  - Toxizität als limitierender Faktor beachtet werden muß ! (11-15)

## 2.4. Allgemeine Diskussion der Versuchsergebnisse

Während den Pharmazeuten und Pharmakologen meist nur die biologische Wirkung von organischen Substanzen und nicht die Effekte des Lösungsmittels Wasser interessiert, ist es in dieser Arbeit untersucht worden, inwieweit Veränderungen des Lösungsmittels zu veränderten physiologischen Wirkungen führen.

Wie bereits am Anfang der Arbeit erwähnt (3 - 8,16,18 - 22, 57 - 78,80,101,106 - 111,115 - 122), zeigen die Ergebnisse vieler Autoren, daß Schweres Wasser bei in vivo - und in vitro - Versuchen einen erheblichen Einfluß auf biologische Systeme ausübt.

In erster Linie werden Strukturen, wie z.B. Membranen, Proteine, Enzyme und Polynukleotide, wenn diese in  $D_2O$  gehalten werden, durch die Ausbildung von starken Deuteriumbrücken anstelle der Wasserstoffbrücken in ihrer Konformation und räumlichen Anordnung gefestigt. Dadurch zeigen sie gegen äußere Einflüsse, wie z.B. Wärmedenaturierung (79,152), eine nachweisbar größere Unempfindlichkeit.

Besonders ausgeprägt ist dieser  $D_2O$  - Schutzeffekt gegen Hyperthermieschädigung beim Thymidineinbau in die DNS ( in vitro ) und bei Transplantationsversuchen von Ascites - Tumor - Zellen ( in vivo ) (17) .

Wir wollten zuerst einmal untersuchen, in wie weit in Schwerem Wasser Zellsuspensionen ( Normal- und Tumorgewebe ) als auch

der Gesamtorganismus von Fischen gegen Wärmedenaturierung geschützt werden können.

Es zeigt sich eindeutig, daß in  $D_2O$  Zellsyntheseleistungen ( sowohl DNS - Synthese von Leber-, Nieren - und von Ascites - Tumor - und von Yoshida - Sarkom - Zellen als auch die Glykolyse von ATZ -Zellen ) nach Hyperthermieperiode signifikant höhere Werte annehmen als bei vergleichbaren Kontrollen in  $H_2O$  (Abb. Nr. 3 - 7, Tabelle 3 und Werte auf Seite 45 ).

$D_2O$  - Fische überleben diese unphysiologischen Bedingungen auch weit aus besser und sterben erst bei höheren Temperaturen als entsprechende  $H_2O$  - Tiere (Abb. Nr. 11).

Es zeigt sich also auch bei diesen Versuchen, daß  $D_2O$  durch stabile Deuteriumbrücken (17,18,20,79) auf die von uns verwendeten biologischen Strukturen erhebliche Stabilisierungseffekte gegen Hyperthermieschädigung ausübt !

Ob durch  $D_2O$  unter unseren Versuchsbedingungen auch Effekte auf biologische Membranen ausgeübt werden, konnten wir mit denen uns zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden nicht feststellen ! (119 - 122)

Auf die Frage, ob maligne Tumore sensibler auf Temperaturerhöhungen als Normalgewebe reagieren, möchte ich hier nicht mehr näher eingehen ( vergl. Abschnitt 2.2.3. und Tab. Nr. 4 u. 6 ) .

Fische, die bei extrem niedrigen Temperaturen (  $3^{\circ}C$  ) gehalten werden, vertragen in Schwerem Wasser diese unphysiologischen Verhältnisse besser als in normalem Wasser (Abb.

Nr. 9 und 10 ).

Durch diese Versuchsreihe ließ sich in vivo deutlich zeigen, daß Schweres Wasser auch bei Hypothermie einen starken Einfluß auf den Gesamtorganismus von Fischen hat !

Wie könnte man diesen Schutzeffekt des Lösungsmittels  $D_2O$  vielleicht erklären ?

In der Kälte muß man immer davon ausgehen, daß durch den physikalischen Vorgang der Unterkühlung diese biologischen Systeme nicht mehr in der Lage sind, die zum "Leben" dringend benötigte Energie zu produzieren. Daher können gewisse Strukturen, wie z.B. Konzentrationsgradienten etc., im Fischorganismus nicht mehr aufrecht erhalten werden, und es kommt zu einer Blockierung vieler biochemischer Vorgänge. In  $D_2O$  dagegen erfolgt - so meinen wir - die Beeinflussung der biologischen Systeme durch Hypothermie aufgrund der Deuteriumbrücken nicht so schnell wie in  $H_2O$ . Dadurch können  $D_2O$  - Fische unter diesen Verhältnissen auch besser leben als die Kontrollen in normalem Wasser !

Auch wir meinen, daß in erster Linie in  $D_2O$  durch die eintretende Deuterierung Zellmembrane, Makromoleküle, Gewebe oder Grenzflächen in ihrer Konformation stabiler werden. Daher kann man sich vorstellen, daß derartige biologische Strukturen in Schwerem Wasser für Moleküle wie Metacain,  $^{14}C$  - Procain und selbst für HTO weniger permeabel werden als in normalem Wasser. Diese Stabilitätserhöhung der biologischen Systeme zeigt sich sehr deutlich an Hand unserer Versuchsergebnisse:

1. In der Verlangsamung der Metacainnarkose bei  $D_2O$  - Fischen ( Abb. Nr. 12-14 ) .
2. In dem unterschiedlichen Bindungsvermögen von  $^{14}C$  - Procain an Fischhomogenat in beiden Lösungsmitteln ( Abb. Nr. 17-18 ) .
3. An den veränderten in vivo - Einbauraten von  $^{14}C$ -Procain in das Gewebe und in das Gehirn in  $H_2O$  und  $D_2O$  (Abb. Nr.15) und
4. bei der verzögerten Penetration von HTO in Schwerem Wasser ( Abb. Nr. 19,20,22,23 ) !

Bei Metabolisierungsstudien von  $^{14}C$  - Procain durch Fischhomogenat konnten wir keine Unterschiede in normalem und Schwerem Wasser feststellen (Abb. Nr. 16 ) . Daher glauben wir sagen zu können, daß der  $D_2O$  - Schutzeffekt auf den Fischorganismus in erster Linie doch auf die in Schwerem Wasser herrschenden Isotopeneffekte zurückzuführen ist.

Man könnte sich auch vorstellen, daß im Organismus eventuell vorhandene "Arzneimittelacceptoren " durch Deuteriumbrücken in ihrem Aufbau und in ihrer Reaktionsfähigkeit verändert werden. Somit kann nach erschwerter Penetration durch das Gewebe ein Pharmakon wie Metacain oder Procain von diesen " Acceptoren " sowohl langsamer gebunden und/ oder auch nach Bindung schlechter metabolisiert werden. Die unmittelbare Folge wäre, daß das Narkotikum Metacain in  $D_2O$  auch langsamer seine Wirkung auf das Zentralnervensystem ausüben könnte .

Ob aber der Grund für die Verzögerung der Fischnarkose tatsächlich in der Stabilisierung von "Arzneimittelacceptoren"

liegt, konnten wir mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht aufklären !

#### Fehlerdiskussion:

Die Fehlermöglichkeiten bei der Herstellung der Tumorzellen - suspensionen für den  $^3\text{H}$  - Thymidineinbau waren verhältnismäßig gering ; denn die Tumorgewebe lagen bereits in vivo als Suspension vor . ( vergl. Methodik M 2 )

Bei den Normalgeweben dagegen mußten die Zellen erst aus ihren Zellverbänden gelöst werden (vergl. Methodik M 4 ), um Einzelzellen zu erhalten. Die Zellgrenzflächen werden durch die Trypsin - Behandlung sicher verändert. Daher sind diese Zellen nicht mehr als vollkommen in Takt zu bezeichnen.

Nach Inkubation mit  $^3\text{H}$  - Thymidin und anschließender Aufarbeitung der Proben wurde die in die DNS der Tumor- und Normalgewebe inkorporierte Aktivität bestimmt (vergl. Methodik M 3). Dabei war vor der Messung ein gründliches Auswaschen mit den vorgeschriebenen Lösungsmitteln nötig ! Denn sonst ergeben sich zu hohe Aktivitätswerte.

Die Temperatur bei den Hypothermieversuchen mit Fischen wurde nur durch Eiskühlung, und nicht wie bei den Hyperthermieuntersuchungen, mit Hilfe eines Thermostaten erreicht. Somit ist die Angabe der Temperatur nicht so exakt und mit gewissen Fehlern behaftet ( Abb. Nr. 9 und 10 ) !

Es wäre denkbar, daß man sich die Schutzeffekte biologischer Systeme durch  $\text{D}_2\text{O}$  in erster Linie dann zu Nutzen machen könnte, wenn Behandlungen am Gesamtorganismus nur

unter extremen äußeren Bedingungen durchgeführt werden können (110,113,145 - 156 ) .

Auch eine Tumorbekämpfung durch Hyperthermie könnte in  $D_2O$  vorgenommen werden. Denn nach Tabelle Nr. 4 und 6 ist der Unterschied in der thermischen Stabilität zwischen Normal- und Tumorzellen in Schwerem Wasser größer als in  $H_2O$ .

Verständlicherweise ist mit einer Unzahl von Komplikationen und Inkompentabilitäten zu rechnen, die man bei weitem jetzt noch nicht übersehen kann, wenn derartige Versuche durchgeführt würden.

Die wohl größte Schwierigkeit dürfte dabei sein, biologische Objekte in vivo mit  $D_2O$  einer hohen Konzentration anzureichern. Als limitierender Faktor muß die verhältnismäßig große Toxizität dieses Lösungsmittels gelten ! (11-15)

### 3. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der vorliegenden Arbeit wollten wir untersuchen , in -  
wieweit 90 % iges Schweres Wasser biochemische Reaktionen  
bei Normal - und Tumorgeweben ( Leber - und Nieren - als  
auch Ascites - Tumor - und Yoshida - Sarkom - Zellen ) in  
vitro beeinflussen kann. Dabei stellten wir uns die Auf -  
gabe , nach Stabilisierungseffekten von  $D_2O$  bei unphysio -  
logischen Lebensbedingungen , z.B. durch Temperatur -  
einwirkungen , zu suchen .

Sowohl bei der Bestimmung der aeroben Glykolyseaktivität  
von Ascites - Tumor - Zellen als auch beim  $^3H$  - Thymidin -  
einbau in die DNS der beiden Normal - und Tumorgewebe  
während gleichzeitig ablaufender Hyperthermie ( bis  $46^{\circ}C$  )  
konnten wir einen eindeutigen  $D_2O$  - Schutzeffekt gegen  
Wärmedenaturierung nur oberhalb von ca.  $41 - 42^{\circ}C$  fest -  
stellen .

Dieser Stabilisierungseffekt des Schweren Wassers gegen  
Hyperthermieschädigung ist aber nach Umstellung der Ver -  
suchsanordnung auch bei Temperaturen unterhalb von  $42^{\circ}C$   
nachweisbar , wenn man die jeweiligen Zellsuspensionen  
erst durch Erwärmung auf  $38 - 46^{\circ}C$  schädigt und dann die  
DNS - Synthese durch den Einbau von  $^3H$  - Thymidin ein -  
heitlich bei  $38^{\circ}C$  mißt . Eine unterschiedliche Thymidinein -  
baurate ist dann eindeutig nur eine direkte Folge der vor -  
herigen Wärmedenaturierung !

An Hand dieser Versuchsreihen kann man feststellen :  
90 % iges Schweres Wasser erhöht schon ab  $40^{\circ}C$  bis zu

einer Temperatur von  $46^{\circ}\text{C}$  die Stabilität der Normal- und Tumorzellen. Der in  $\text{D}_2\text{O}$  gegenüber  $\text{H}_2\text{O}$  immer erniedrigte Baseneinbau bei  $38^{\circ}\text{C}$  ist wohl auf die Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen, die durch den in Deuteriumoxid auftretenden Isotopeneffekt erklärt werden kann.

Darüber hinaus können wir eindeutig sagen, daß in  $\text{D}_2\text{O}$  Tumorgewebe durch Temperaturerhöhung entschieden gravierender in seiner DNS-Synthese gehemmt wird als Normalgewebe!

Den Schutzeffekt von Schwerem Wasser auf den Gesamtorganismus von Fischen untersuchten wir bei der Resorption von unterschiedlichen Pharmaka wie Metacain und Procain und auch bei  $\text{HTO}$ .

Die Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß in  $\text{D}_2\text{O}$  sowohl die Aufnahme eines Arzneimittels als auch die anschließende Eliminierung *in vivo* und *in vitro* unter unseren Versuchsbedingungen erheblich verzögert werden. Die daraus resultierende Stabilisierung dieser biologischen Strukturen durch  $\text{D}_2\text{O}$  beruht nach unserer Meinung in erster Linie auf der Ausbildung von stärkeren Deuteriumbrücken anstelle der allgemein vorhandenen Wasserstoffbrücken. Dadurch können biologische Strukturen wie Makromoleküle, Polynukleotide und physiologische Zellmembranen oder auch eventuell denkbare "Arzneimittelacceptoren" in ihrer Konformation stark verändert werden und in ihrem Reaktionsverhalten gegenüber biochemisch ablaufenden Prozessen beeinträchtigt werden.

Somit werden chemische Noxen , die auf das Zentralnerven - system oder auf das Gewebe der Fische wirken , in Abhängig - keit von der  $D_2O$  - Konzentration und von den äußeren Ver - suchsbedingungen unterschiedlich stark abgeschwächt !

Diese Stabilisierung der Versuchstiere durch  $D_2O$  spiegelt sich auch bei den Hypo - und Hyperthermieuntersuchungen wi - der. Diese extremen Umwelteinflüsse vertragen  $D_2O$  - Fische sichtbar besser und überleben sie länger als Kontrollen in  $H_2O$  .



#### 4. EXPERIMENTELLER TEIL

##### MATERIAL :

###### 1. Tiere

a. Ratten: männliche und weibliche Wistarratten , ca. 150 - 250 g schwer und 8 - 16 Wochen alt , wurden bezogen von der Firma Hagemann , Hannover . Sie erhielten als Nahrung eine Standardkost ( Altrumin R ) und Trinkwasser ad libitum .

b. Mäuse : männliche und weibliche Albino-Mäuse, ca. 25 g schwer und 4 - 5 Wochen alt , wurden aus dem Physiologischen Institut der FU Berlin besorgt . Sie erhielten als Nahrung eine Standardkost ( Altrumin R ) und Trinkwasser ad libitum.

c. Fische : Black Mollies ( Mollienisia spec. ) wurden bei der Firma Karstatt in Berlin gekauft und mit Fischtrocken - futter ( Tetra Min ) ernährt . Sie waren ca. 0,8 - 1,2 g schwer .

###### 2. Reagentien :

Alle Reagentien hatten, wenn nichts anderes angegeben , den Reinheitsgrad " pro analysi " . Die organischen Lösungsmittel wurden vor Versuchsbeginn destilliert und vor Licht geschützt in dunklen Gefäßen aufbewahrt. Die Szintillations - chemikalien waren Originalsubstanzen der Fa. Beckmann Inc. oder der Fa. Merck .

Der Testsatz zur Laktatbestimmung bei der Glykolyse von Ascites - Tumor - Zellen war von der Fa. C.F. Boehringer .

###### weitere verwendete Substanzen

D<sub>2</sub>O ( reinst ) 99,7 % : Fa. Roth, Karlsruhe  
Fa. NEN, Dreieichenhain

Procain . HCL : Fa. Hoechst, Frankfurt a.M.

$^{14}\text{C}$  - Procain . HCL

2,84 mCi / mMol : Fa. NEN, Dreieichenhain

Thymidin - methyl - T : The Radiochemical Centre

2,0 Ci / mMol Amersham

HTO 871  $\mu$  Ci / 5 ml : The Radiochemical Centre  
Amersham

#### Verwendete Geräte:

Flüssigkeitsszintillations - : Fa. Beckmann, München

zähler - LS - 150

DC - Scanner II mit Auto - : Fa. Berthold , Wildbad (157)

chronschreiber

Atomixmill : Fa. Lahl, Müllheim

Gefriertrocknungsanlage ; : Fa. Christ, Aibach - Ober -

" Delta I " bernbach

Mikromat - Verbrennungsanlage : vergl. Lit. 161

Warburg ' scher Schüttel - : Fa. Braun, Melsungen

thermostat

Varian A - 60 A ( "NMR " ) mit : Fa. Varian, Darmstadt

Digitalvoltmeter Hewlett - Packard, Zürich

Eppendorf - Photometer : Fa. Netheler + Hinz

Hamburg

Olivetti - Tischrechner : Fa. Olivetti, Frankfurt a.M.

" Programma 101 "

## PHYSIKALISCH - CHEMISCHE METHODEN

### 1. Dünnschicht - Chromatographie und Messung der Radio - aktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten

Die zur Trockne eingeeengten Extrakte wurden in 1,00 ml Äthanol aufgenommen und davon 0,1 ml mit einer Kapillare auf Dünnschichtplatten ( Kieselgel HF<sub>254</sub> , Glas , Fa. Merck ) aufgetragen . Anschließend wurde in dem angegebenen Fließ - mittelsystem chromatographiert . Die Lage der radioaktiven Substanzen wurde durch Aktivitätsmessung mit dem " DC - Scanner " - mit Autochronschreiber ermittelt (157) . In - aktive Referenzsubstanzen wurden mit Sprühreagentien ange - färbt oder mit Hilfe der " UV " - Lampe identifiziert.

Bei quantitativen Bestimmungen wurde die Aktivitätsmenge mit Hilfe eines Integralschreibers ermittelt ; dabei lagen die Zähl ausbeuten des " DC - Scanners " bei einem Abstand von 1 mm ( Oberfläche DC - Platte / Zählrohr ) für  $^{14}\text{C}$  bei etwa 25 % ( vergleiche Methodik M 6 ) .

### 2. Flüssigkeits - Szintillations - Meßtechnik

Zur Radioaktivitätsmessung von Lösungen wurde ein Flüssigkeits - Szintillationszähler benutzt . Für Tritium - und  $^{14}\text{C}$  - Messungen wurden verschiedene Energie - Kanäle verwendet; die Zähl - ausbeuten wurden durch die Kanalverhältnis - Methode mit einem externen Standard oder mit der " Internen Standard - Methode " bestimmt . Die jeweils verwendete Szintillator - Lösung wird bei den Methodikbeschreibungen in ihrer Zu - sammensetzung angegeben !

### 3. UV - Messungen mit dem Eppendorf - Photometer

Die Bestimmung der Pyridinnucleotid - Konzentration wurde bei 366 nm mit dem angegebenen Photometer bei 25 °C durchgeführt .

### 4. Analytik von D<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O - Mischungen

In Zusammenarbeit mit K. REHSE ( Pharm. Inst. FU Berlin ) erarbeiteten wir eine schnelle und hinreichend genaue Gehaltsbestimmung von D<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O - Mischungen mit Hilfe der Kernresonanz ( Nuclear Magnetic Resonance = "NMR " ) . Die Methodik beruht auf der Verschiedenheit der magnetischen Momente der Kerne H und D ; das magnetische Moment von Deuterium beträgt rund 1/3 desjenigen für H .

Die zu messende Probe befindet sich innerhalb eines Radiofrequenzfeldes in einem höchst homogenen starken äußeren Magnetfeld H<sub>0</sub> . Bei der eintretenden Resonanz der Protonen in der Probe wird ein Abfall der Radiofrequenzspannung infolge von Energieabsorption durch Umorientierung des magnetischen Kernmomentes beobachtet und durch geeignete Vorrichtung des Gerätes gemessen ! Das in der Analysenlösung befindliche Deuterium dagegen tritt wegen des unterschiedlichen magnetischen Momentes bei dieser Radiofrequenz nicht in Resonanz .

Die Empfindlichkeit dieser Methode hängt ab von der Geschwindigkeit , mit der Radiofrequenzenergie von den Protonen aufgenommen und absorbiert wird und natürlich von der Trägheit des Gerätes und des Schreibers .

Der Schreiber des NMR - Gerätes zeichnet selbständig während

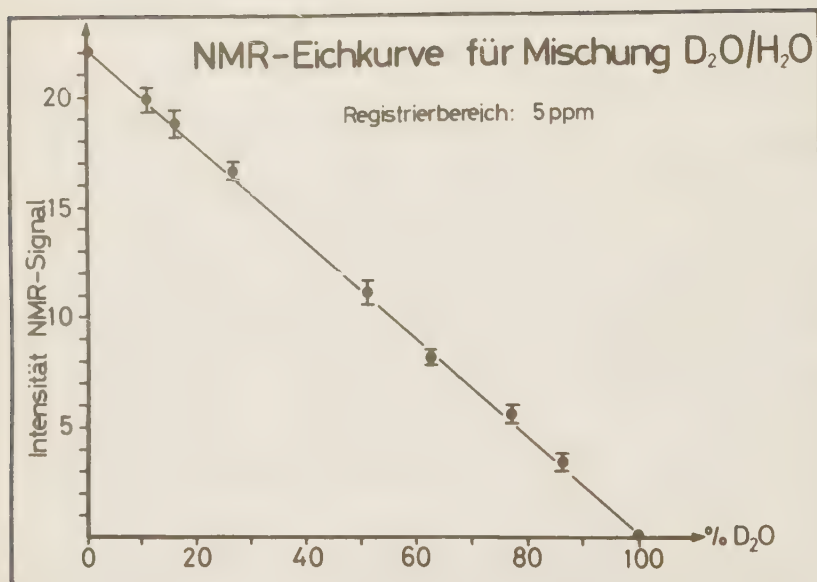
der Bestimmung der eingegebenen Probe ein Spektrum auf . In unseren Fällen erkennen wir nur im Registrierbereich " 5ppm " mehr oder weniger große Peaks .

Unter konstanten einmal gewählten Versuchsbedingungen ist bei der Analyse mit reinem Wasser ( Aq. bidest ) dieser auf - gezeichnete Peak flächenmäßig am größten , bei der mit rei - nem Schweren Wasser ( 99,7 % ) dagegen fast nicht mehr er - kennbar. Dies ist erklärlich , da bei reinem  $D_2O$  keine Pro - tonen vorhanden sind , die mit dem angelegten Magnetfeld in Resonanz treten können. Alle Zwischenkonzentrationen an  $D_2O$  müssen folglich innerhalb dieser gefundenen Extrema liegen . Die vom NMR - Gerät aufgezeichneten Peaks werden für jede zu messende Probe durch das angeschlossene Digitalvoltmeter automatisch integriert .

Diese für die Flächen ermittelten Werte für jede Analyse werden in ein Koordinatensystem eingebracht . Die beiden Extremwerte für reines Wasser und reines Schweres Wasser werden durch eine Gerade verbunden . Nun zeigt sich ein - deutig , daß alle anderen Werte der Zwischenkonzentrationen an  $D_2O$  auf oder in direkter Nähe dieser Eichgeraden liegen ; d.h. die Flächen der von dem Gerät aufgenommenen Peaks sind direkt proportional der  $D_2O$  - Konzentrationen ! (Abb. Nr.24)

Da das Auflösungsvermögen des NMR - Gerätes , das von vielen äußeren Faktoren abhängt , verschieden groß ist , muß bei jeder durchzuführenden  $D_2O$  - Gehaltsbestimmung reines  $H_2O$  und reines  $D_2O$  als Testsubstanzen mitgemessen werden ; denn von der Größe dieser beiden Extrema hängt unmittelbar die

Abb. Nr. 24



Bestimmung der  $D_2O$  - Konzentrationen in verschiedenen  
Mischungen von  $H_2O$  und  $D_2O$  durch "NMR"

Geräteeinstellung:

Temperatur: 36 °C

Registrierbereich : 5ppm  
Spektrumamplitude : 0,5  
Integralamplitude : 80  
R.F. - Field : 0,2 mG  
Filter : 4 DB

Ordinate: Intensität des "NMR" - Signals für die jeweilige Probe nach Integration des aufgenommenen Peaks .

Aufgetragen wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen für  $n = 8 - 10$  .

Steigung der aufzustellenden Eichgeraden ab !

Bei den unbekannten Proben ist es dann nur noch notwendig ,  
für die ermittelten Flächengrößen die entsprechenden  $D_2O$  -  
Konzentration aus der Meßgeraden abzulesen . (158)

## BIOCHEMISCHE METHODEN

### METHODIK M 1 :

#### EINSTELLUNG DER TUMORZELLSUSPENSIONEN AUF EINEN GEHALT

#### VON 4 PROZENT (ASCITES - TUMOR und YOSHIDA - SARKOM )

Ausgewachsene männliche Albino - Mäuse aus der Zucht des Physiologischen Institutes der FU Berlin wurden durch intra - peritoneale Impfung mit 0,1 bis 0,2 ml Ascites - Tumor - Zellsuspension ( Stamm: Stockholm ELD ) inriziert . Nach 5 - 7 Tagen wurden diese Tiere durch Dekapitation getötet, die Tumorsuspension mit einer Pipette aus dem Bauchraum entnommen und in eiskalten  $H_2O$  - bzw.  $D_2O$  ( 90 % ig ) - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , überführt . Den Puffergemischen wurde vorher Heparin in kleinen Mengen ( ca. 10 mg / 10 ml ) zugesetzt , um das Zusammenballen der einzelnen Zellen zu vermeiden. Nach mehrmaligem Waschen in den jeweiligen Pufferlösungen wurden die Ascites - Tumor - Zellen mit Hilfe eines " Hämatokritröhrchens " auf einen Gehalt von 4 % eingestellt.

Auf die oben beschriebene Weise wurde auch die Yoshida - Sarkom - Zellsuspension gewonnen und auf den gewünschten Zellgehalt eingestellt . Nur waren dafür weibliche Albino - Mäuse derselben Zucht nötig , da dieses maligne Gewebe auf diesem Wirt gezüchtet worden war !

Ich danke E. LISS ( Klinikum Steglitz - Berlin , Klinische Chemie ) für die großzügige Überlassung dieses Sarkoms !

METHODIK M 2 :

BESTIMMUNG DER AEROBEN GLYKOLYSE VON ASCITES - TUMOR -  
ZELLEN WÄHREND HYPERTHERMIE ( GEBILDETES LAKTAT )

Die Ascites - Tumor - Zellen wurden nach Methodik M 1 in vivo gezüchtet, und die Zellsuspension auf einen Gehalt von 4 % eingestellt . In beiden verwendeten Medien (  $H_2O$  - und 90 % igem  $D_2O$  - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer ,  $pH = 7,4$  ) wurden 3,4 mg Glukose / ml Ansatz zugesetzt . Die jeweiligen Analysenproben wurden 30 Minuten lang im Warburg ' schen Schüttelthermostaten auf die angegebene Temperatur ( 38 - 46 °C ) erhitzt. Die Reaktion wurde nach dieser Zeit durch Einbringen der Proben in Eis gestoppt und danach die Zellen abzentrifugiert ( 4000 U / Min. ). Die so erhaltenen Inkubationsüberstände wurden mit 1,0 ml 0,6 n  $HClO_4$  unter Eiskühlung enteiweißt und mit 1 n NaOH alkalisiert (  $pH$  8 - 9 ) .

Von dieser Lösung wurden jeweils 0,1 ml entnommen und die darin enthaltene Menge Laktat nach HOHORST (88) mit LDH und  $NAD^+$  im Eppendorf - Photometer bestimmt = optischer Test bei 366 nm .

Dieser Messung liegt folgende Reaktionsgleichung zu Grunde :



( vergl. Abb. Nr. 1 )

METHODIK M 3 :

BESTIMMUNG DES  $^3\text{H}$  - THYMIDINEINBAUES IN DIE DNS VON  
TUMOR - UND NORMALZELLEN ( IN VITRO ) (159,160)

Die jeweiligen Zellsuspensionen ( 4 % ig ) wurden in  $\text{H}_2\text{O}$  - bzw. 90 % igem  $\text{D}_2\text{O}$  - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , mit 5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  - Thymidin / ml Ansatz  $\hat{=}$   $6,05 \cdot 10^{-1} \mu\text{Ci} / \text{ml}$   $\hat{=}$   $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$  bei der angegebenen Temperatur inkubiert . Die Reaktion wurde durch Einbringen der Probefläschchen in Eis gestoppt ; von jeder einzelnen Probe wurden 0,1 ml des Ansatzes entnommen und auf einen Filterpapierstreifen ( ca. 4 cm breit und 50 cm lang , Whatman 3 MM ) aufgetragen . Für jedes Aliquot betrug die benetzte Fläche etwa 2 mal 3 cm . Diese so mit radioaktivem Material betupften Streifen wurden wie folgt behandelt , um die von den Zellen nicht inkorporierte Menge Thymidins zu entfernen : Nach der Trocknung mit heißer Luft wurden die Papierstreifen in eiskalte 10 % ige und zweimal in 5 % ige Trichloressigsäurelösungen eingetaucht. Für 100 Proben war etwa ein Liter der jeweiligen Waschflüssigkeit nötig. Dann wurden die Proben zweimal mit einem Äther / Äthanolgemisch ( 500 ml , 1 : 1 , v : v ) und zweimal mit reinem Äther ( 250 ml ) behandelt . Nach erfolgter Lufttrocknung wurde jedes Aliquot einzeln ausgeschnitten und die verbliebene Aktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. (vergl. auch Tab. Nr. 5 !)

Szintillationsgemisch :      5,0 g PPO ( 2,5 - Diphenyloxazol )  
                                 100,0 g Naphthalin  
                                 ad 1000,0 ml Dioxan

Einbau von  $^3\text{H}$  - Thymidin in verschiedene Zelltypen  
in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  und  $\text{D}_2^{16}\text{O}$

30 minütige Inkubation bei  $38^\circ\text{C}$  ohne Thymidin ,  
danach 30 Min. mit Thymidin ;  $n = 5$

( vergleiche Methodik M 1 + 2 )

| Zelltyp         | IpM / 0,1 ml<br>Ansatz | $\mu\text{Mol Thymidin} /$<br>100 mg Feuchtge-<br>wicht |
|-----------------|------------------------|---------------------------------------------------------|
| Normales Wasser |                        |                                                         |
| Leber (tryp.)   | 2467 $\pm$ 92          | 0, 550 . $10^{-4}$                                      |
| Niere (tryp.)   | 1558 $\pm$ 114         | 0, 348 . $10^{-4}$                                      |
| Ascites         | 4719 $\pm$ 108         | 1, 055 . $10^{-4}$                                      |
| Yoshida         | 4461 $\pm$ 245         | 0, 996 . $10^{-4}$                                      |
| Schweres Wasser |                        |                                                         |
| Leber (tryp.)   | 2110 $\pm$ 93          | 0, 471 . $10^{-4}$                                      |
| Niere (tryp.)   | 1132 $\pm$ 68          | 0, 253 . $10^{-4}$                                      |
| Ascites         | 4107 $\pm$ 105         | 0, 917 . $10^{-4}$                                      |
| Yoshida         | 3754 $\pm$ 141         | 0, 837 . $10^{-4}$                                      |

Tabelle Nr. 5

$^3\text{H}$  - Thymidineinbauraten in die DNS von Tumor - und  
Normalzellen nach Hyperthermieperiode .

Für die Berechnung dieser Werte wurde die Zählausbeute  
aus einer Quenchkurve ermittelt. Sie betrug = 24,9 % .

METHODIK M 3 a :

ERRECHNUNG DER REGRESSIONSGERADEN FÜR DEN  $^3\text{H}$  - THYMIDIN

EINBAU IN TUMOR - UND NORMALGEWEBE IN  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$

( Versuchsanordnung vergl. Methodik M 3 )

( Abb. Nr. 4 - 7 )

( Tabelle Nr. 6 )

Für jede Gewebeart ( 4 % ige Zellsuspensionen von trypsini - sierten Leber - und Nierenzellen und von Ascites - Tumor - und Yoshida - Sarkom - Zellen ) wurden in  $\text{H}_2\text{O}$  -bzw. 90 % igen  $\text{D}_2\text{O}$  - Puffersystemen ( pH = 7,4 ) der jeweilige  $^3\text{H}$  - Thymidin - einbau nach vorangegangener Hyperthermiephase ( 38 - 46 °C ) einheitlich bei 38 °C bestimmt .

Für jede Temperatur wurden 5 Werte ermittelt und daraus das Mittel errechnet mit Standardabweichungen .

In beiden Medien wurden zwei Reihen gegenübergestellt :

$\text{H}_2\text{O}$  mit und ohne Glukosegabe ( 3,4 mg / ml Ansatz ) und  $\text{D}_2\text{O}$  in analoger Weise .

Somit erhielten wir für jede Versuchsreihe eine Regressions - gerade , d.h. eine errechnete Gerade unter Berücksichtigung der gemittelten Meßpunkte bei der halblogarithmischen Dar - stellung dieser Untersuchungen (171,172).

Erläuterungen für die Angaben in Tabelle Nr. 6 :

x : Angaben der Temperatur ( linear aufgetragen ) °C

y : Angaben des prozentualen  $^3\text{H}$  - Thymidineinbaues  
(logarithmisch aufgetragen), bezogen auf die Kontrolle.

y = a + bx = allgemeine Gleichung der Regressionsgeraden

$s_{x.y}^2 =$  Standardabweichung der  $\hat{y}$ - Werte für ein eingegebenes  $x$

$r$  = Korrelationskoeffizient

$\frac{H_2O -}{D_2O -} / \frac{H_2O +}{D_2O +} = \underline{\text{mit}} \text{ und } \underline{\text{ohne}} \text{ Glukosegabe in den beiden}$   
Lösungsmitteln

| Regressionsgeraden für den Temperaturbereich 38 - 46 °C |                                   |             |       |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------|
| Leber<br>(tryp.)                                        | Regressionsgerade<br>$y = a + bx$ | $S_{x.y}^+$ | r     |
| H <sub>2</sub> O -                                      | $y = 6,770 - 0,128 x$             | 0,081       | 0,985 |
| H <sub>2</sub> O +                                      | $y = 6,709 - 0,126 x$             | 0,122       | 0,967 |
| D <sub>2</sub> O -                                      | $y = 4,656 - 0,073 x$             | 0,036       | 0,991 |
| D <sub>2</sub> O +                                      | $y = 4,344 - 0,063 x$             | 0,014       | 0,995 |
| Niere<br>(tryp.)                                        |                                   |             |       |
| H <sub>2</sub> O -                                      | $y = 6,696 - 0,127 x$             | 0,094       | 0,980 |
| H <sub>2</sub> O +                                      | $y = 6,590 - 0,127 x$             | 0,110       | 0,971 |
| D <sub>2</sub> O -                                      | $y = 5,048 - 0,083 x$             | 0,068       | 0,976 |
| D <sub>2</sub> O +                                      | $y = 3,990 - 0,055 x$             | 0,035       | 0,985 |
| Ascites<br>(ELD)                                        |                                   |             |       |
| H <sub>2</sub> O -                                      | $y = 8,230 - 0,168 x$             | 0,082       | 0,991 |
| H <sub>2</sub> O +                                      | $y = 7,965 - 0,159 x$             | 0,077       | 0,991 |
| D <sub>2</sub> O -                                      | $y = 6,430 - 0,119 x$             | 0,069       | 0,988 |
| D <sub>2</sub> O +                                      | $y = 6,188 - 0,111 x$             | 0,089       | 0,977 |
| Yoshida<br>(AscitesF.)                                  |                                   |             |       |
| H <sub>2</sub> O -                                      | $y = 8,898 - 0,184 x$             | 0,108       | 0,988 |
| H <sub>2</sub> O +                                      | $y = 8,150 - 0,163 x$             | 0,080       | 0,991 |
| D <sub>2</sub> O -                                      | $y = 7,119 - 0,136 x$             | 0,095       | 0,982 |
| D <sub>2</sub> O +                                      | $y = 6,182 - 0,110 x$             | 0,077       | 0,982 |

Tabelle Nr. 6

Regressionsgeraden des <sup>3</sup>H - Thymidineinbaues in die DNS von Tumor - und Normalgewebe nach Hyperthermie .

Vergl. Abb. Nr. 4 - 7 und nähere Erläuterungen Methodik M 3 a .

METHODIK M 4 :

ZELLISOLIERUNGSMETHODE NACH DULBECCO - VOGT (102 -104)

Das Versuchsmaterial ( Leber und Nieren von männlichen und weiblichen Ratten ) wurde nach Tötung der Tiere möglichst bindegewebsfrei herauspräpariert . Nachdem das in den Organen noch befindliche Blut ausgetropft war , wurden diese nochmals in eiskaltem wässrigem Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , gespült . Danach wurden die kleingeschnittenen Organteile einige Stunden bei ca. 25 °C mit einer 0,25 % igen " Trypsinlösung " ständig gerührt , und alle 20 Min. die bereits freigesetzten Zellen in ein mit eiskaltem Puffer , pH = 7,4 , gefülltes Gefäß überführt . Die zuerst abgegossenen Zellen wurden verworfen , alle weiteren Abgüsse wurden nach Beendigung der Zellisolierung zentrifugiert und mehrmals mit neuem eiskaltem H<sub>2</sub>O - bzw. D<sub>2</sub>O ( 90 % ig ) Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , gewaschen. In beiden Medien wurden die auf diese Weise erhaltenen Zellen mit einem " Hämatokrit - röhrchen " auf eine 4 % ige Suspension eingestellt .  
( vergleiche Methodik M 1 )

|                        |        |                                                         |         |
|------------------------|--------|---------------------------------------------------------|---------|
| <u>Trypsinlösung :</u> | 2,5    | g Trypsin " Difco "                                     | 1 : 250 |
|                        | 8,0    | g NaCL                                                  |         |
|                        | 0,2    | g KCL                                                   |         |
|                        | 1,15   | g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O |         |
|                        | 0,2    | g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       |         |
|                        | 0,1    | g MgCL <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O                |         |
| ad                     | 1000,0 | ml Aq. bidest.                                          |         |

Ich danke Herrn Geissler aus dem Max - Planck - Inst. für Zellphysiologie in Berlin für seine theoretische Unterweisung in diese Methode .

METHODIK M 5 :

BESTIMMUNG DER IN DAS FISCHGEWEBE UND IN DAS FISCHGE -  
HIRN EINGEBAUTEN  $^{14}\text{C}$  - PROCAINAKTIVITÄTEN ( in vivo )

Ca. 0,9 g schwere Fische ( *Mollienisia spec.* ) wurden bei ständiger Luftzufuhr in normalem und Schwerem Wasser (40 % ig) mit einer  $^{14}\text{C}$  - Menge des Procains von 173,5 mg / l  $\hat{=}$  0,129  $\mu\text{Ci}$  / ml gehalten . Die Tiere in  $\text{D}_2\text{O}$  wurden an das neue Medium ca. 1 - 2 Stunden gewöhnt . Nach verschiedenen Zeiten ( 3,5 Min. - 4 Std. ) wurden die entsprechenden Fische aus den Becken herausgenommen , abgetrocknet , durch sehr kurzes Einbringen in wenig flüssige Luft getötet , gefriergetrocknet und danach jeweils ein Aliquot des Gewebes bzw. des Gehirns verbrannt .

Als Absorptionsflüssigkeit für das gebildete  $^{14}\text{C}$  -  $\text{CO}_2$  wurde 1,0 ml frisch destilliertes  $\beta$  - Phenyläthylamin in jedes Probefläschchen vorgelegt . Die Aktivität wurde anschließend im Flüssigkeitsszintillationszähler mit 10,0 ml Toluol - PPO - Szintillationsgemisch gemessen .

Zusammensetzung des Szintillatorgemisches:

6,0 g PPO ( 2,5 - Diphenyloxazol )  
850,0 ml Toluol  
150,0 ml Äthanol ( unvergällt )

( vergl. Abb. Nr. 15 )

METHODIK M 6 :

INKUBATION VON  $^{14}\text{C}$  - PROCAIN MIT FISCHHOMOGENAT

BEI 37 °C ( in vitro )

Herstellung des Fischhomogenates :

Die Fische ( *Mollienisia spec.* ) wurden mit dem Rasier -  
messer getötet und danach in wenig  $\text{H}_2\text{O}$  - bzw. 40 % igem  
 $\text{D}_2\text{O}$  - Krebs - Ringer - Phosphat - Puffer , pH = 7,4 , auf -  
genommen . Daraufhin wurden sie unter Eiskühlung mit einem  
Atomixmill homogenisiert . Für 3,0 ml Puffergemisch wur -  
den 100 mg Fischfeuchtgewicht berechnet !

Inkubationsbedingungen :

In jeweils 3,0 ml Homogenatsuspension wurden 110  $\gamma$   $^{14}\text{C}$  - Pro -  
cain  $\hat{=}$  1,041  $\mu$  Ci eingesetzt , und diese Probefläschchen  
im Warburg ' schen Schüttelthermostat bei 37 °C inkubiert .  
(Kontrollversuche wurden auch in Eis durchgeführt , um  
eventuelle Einflüsse des Gewebes auf das Pharmakon aus -  
schließen zu können ) . Nach verschiedenen Zeiten ( 0,10,  
20,30 und 40 Minuten ) wurde die Reaktion durch Einbringen  
der Proben in Eis gestoppt .

Probenaufarbeitung :

Der gesamte Inhalt der Inkubationsansätze bei 0 °C und 37 °C  
wurde einzeln in Zentrifugengläser. überführt . Zum Nach -  
spülen 3 ml Äther verwendet , der wiederum zum Extrahieren  
des Ansatzes benutzt wurde . Nach kräftigem Schütteln wurde  
10 Minuten bei 4000 U / Min. zentrifugiert und der Äther mit  
einer Pipette abgehebert . Spülen und Extrahieren wurden  
insgesamt dreimal wiederholt .

Die gesammelten Ätherfraktionen wurden im Druckluftstrom bei leichter Erwärmung auf 40 °C auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft . Die festen Rückstände wurden dann in 1,0 ml Äthanol wieder aufgenommen .

Messung der Aktivitäten aus dem Inkubationsgemisch :

Die in den Inkubationsüberständen (  $H_2O$  und  $D_2O$  ) nach der Ätherextraktion noch enthaltene Aktivität wurde im Flüssig - Szintillationszähler bestimmt .

Szintillatorgemisch : siehe Methodik M 5 .

Die in das Gewebe aufgenommene Aktivität wurde nach Gefrier - trocknung des Homogenates durch Verbrennung des Gutes ermittelt ( vergl. Methodik M 5 ) .

Die durch Ätherextraktion aus dem Homogenat gewonnenen Metabolite wurden aus der äthanolischen Lösung ( 1,0 ml s.o. ) auf zwei Arten bestimmt :

1. Gesamtaktivität im Flüssigszintillationszähler ( in einem Aliquot gemessen ) und
2. Aufgliederung in die einzelnen Metabolite mit dem " DC - Scanner " ( in einem Aliquot ) auf DC - Platten aus Glas .

( vergl. Abb. Nr. 16 - 18 )

METHODIK M 7 :

BESTIMMUNG DES KÖRPERWASSERAUSTAUSCHVOLUMENS BEI  
FISCHEN MIT HTO IN SCHWEREM UND NORMALEM WASSER (144)

Ermittlung der Fischgewichte :

ca. 50 ml Aquariumwasser oder eine entsprechende Mischung von  $D_2O$  / Aquariumwasser in der jeweilig für den Versuch verwendeten  $D_2O$  - Konzentration ( 5 - 40 % ) werden in ein Becherglas gefüllt und beides auf der analytischen Waage zusammen ausgewogen . Die Fische werden mit einem Sieb einzeln aus dem Aquariumbecken oder aus dem  $D_2O$  - Gewöhnungsbecken herausgenommen , vorsichtig mit Zellstoff abgetrocknet und in das Becherglas gesetzt . Nach erneuter Wägung erhält man dann das Fischgewicht durch die Bildung der Differenz aus den beiden Werten .

Ermittlung der HTO - Aktivität im Aufnahmebecken :

Die Fische werden nach 180 Min. bzw. 24 Std. aus dem 100,0 ml enthaltenen HTO - Aufnahmebecken ( Mischungen Aquariumwasser / HTO oder Aquariumwasser / HTO /  $D_2O$  in der jeweiligen Konzentration , 5 - 40 % , ) herausgenommen und in die entsprechenden Austauschbecken überführt . Nach der oben angegebenen Zeit werden aus den HTO - Aufnahmebecken 2 mal je 0,1 ml mit einer Eppendorfpipette entnommen und in Meßkolben mit Aq. dest. auf 100,0 ml verdünnt . Von diesen Verdünnungen werden dann je 3 mal 0,5 ml im Flüssig - Szintillations - Zähler mit Szintillatormischung gemessen . Die HTO - Aktivität wird auf  $\mu$  Ci / ml Aufnahmebecken umgerechnet . Die eingesetzte Aktivität beträgt ca. 3  $\mu$  Ci / ml .

### Ermittlung des Körperwasseraustauschvolumens :

Zur Zeit 0 ( d.h. vor Einsetzen der Fische ) sowie nach 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten wird jeweils 1,0 ml mit einer Pipette aus den Austauschbecken entnommen und die darin enthaltene HTO - Aktivität wie oben beschrieben bestimmt (  $\mu$  Ci / ml ) .

In die primär inaktiven Austauschbecken wird von den Fischen im Laufe der Zeit ( 0 - 240 Min. ) vorher aufgenommenes Tritiumwasser übertragen und mit der darin enthaltenen Flüssigkeit verdünnt . Die in dem jeweiligen ml ermittelte HTO - Aktivität wird dann auf das Gesamtvolumen des Austauschbeckens (100,0 ml) umgerechnet ; dabei muß aber berücksichtigt werden, daß das Wasservolumen dieser Becken durch Entnahme von Analysenproben zu den verschiedenen Zeiten abnimmt !

Da die Tritiumwasseraktivität der Aufnahmebecken (  $\mu$  Ci/ml ) und die HTO  $\pm$  Aktivität der gesamten Austauschbecken (100,0 ml ) bekannt sind , kann man nun ausrechnen , wieviel ml HTO die Fische vorher in ihren Körpern aufgenommen und nachher auch wieder eliminiert haben .

Mit dieser Methode war es möglich , das Körperwasseraustauschvolumen bei Fischen *in vivo* zu bestimmen .

Szintillationsgemisch: vergl. Methodik M 3

( vergl. Abb, Nr. 19, 20, 22, 23 )

( vergl. Schema der Versuchsanordnung auf S.78 ! )

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Riesenfeld , E.                      Lehrbuch der anorg. Chemie  
Zürich , 106 ff (1948)
2. Murphy , G.                      Phy. Rev. 39, 164 (1932)  
Brickwedde , F.                      40, 464 (1932)  
Urey , H.C.
3. Urey, H.C.                      Science 78, 566 (1933)
4. Lewis, G.N.                      Science 79, 151/53 (1934)
5. Hansen, Kl.                      Klinische Wochenschrift  
Belgen , E.                      42, 1113 (1935)
6. Taylor, Swingle,                      J. of chem. Physic.  
Eyring, Frost                      I, 751 (1933)
7. Lewis, G.N.                      siehe 4. S.151
8. Brun, J.                      Det Kongelige Norske Videns -  
Tronstadt, L.                      kabers Selskapsskrifter  
Trondheim 7, 171 (1934)
9. Chorney, W.                      Biochim. Biophys. Acta  
Scully, N.J.                      37, 280 (1960)  
Crespi, H.L.  
Katz, J.J.
10. Mandeville, S.E.                      Science 146, 769 (1964)  
Crespi, H.L. Katz, J.J.
11. Barbour, H.G.                      Yale J. Biol. a. Med.  
                                         9, 551 (1937)
12. Katz, J.J.                      J. Nat. Canc. Inst.  
Crespi, H.L.                      18, 641 - 659 (1957)  
Hasterlik, R.J.  
Finkel, A.J.  
Thomson, J.F.
13. Czajka, Finkel, A.F.                      Ann. N.Y. Acad. Sci.  
                                         84, 770 - 79 (1960)
14. Hughes, A.                      Science , Washington  
Calvin, M.                      127, 1445 (1958)

15. Hughes, A. Ann. N.Y. Acad. Sci.  
Bennet, 84, 763 -69 (1960)  
Calvin, M.
16. Katz, J.J. Strahlentherapie  
Crespi, H. 138, 739 (1969)  
Thomson, J.F.
17. Wenzel, M. Hoppe - Seyler's Z. Physiol.  
Stöhr, W. Chem. 351, 737 - 740 (1970)
18. Den ' Ko, E.I. Citologija Leningrad  
9, 8, 940 - 948 (1967)
19. Lewin , S. Arch. of Biochem. Biophysics  
115, 62 - 66 (1966)
20. Lewin , S. The Biochem. J.  
Proceedings of the biochem.Soc.  
457<sup>th</sup> Meeting 18, Febr. 1966
21. Wiberg, K.B. Chem. Rev. 55, 713 (1955)
22. Kritchevsky, D. Ann. N.Y. Acad. Sci.  
84, 575 (1960)
23. Ansbacher, S. Vitamins and Hormones,  
edited by Thimann und Harris  
Vol. II
24. Simon, H. Angewandte Chemie  
Palm, D. 78, Nr. 22 , 993 ff (1966)
25. Christen, H.R. Grundlagen der allg. und anorg.  
Chemie, Sauerländer - Verlag  
Frankfurt , 326 (1968)
26. Wenzel, M. Tritium - Markierung  
Walter de Gruyter und Co.  
Berlin (1962) S. 148 - 151
27. Benedict, Gailar, N. J.chem. Phys.  
Plyler, E.K. 24, 1164 (1956)
28. Hollemann, A.F. Lehrbuch der anorg. Chemie  
Wiberg, E. Walter de Gruyter Berlin  
909 - 911 (1971)

29. Gmelin - Handbuch Handbuch der anorg. Chemie  
Verlag Chemie Weinheim (1964)  
8. Auflage , S. 1963
30. Polany, M. Nature 135, 23 (1935)
31. Bonhoeffer, K.F. Franz. Faraday Soc.  
34, 252 - 259 (1938)
32. Farkas, A. und L. Nature 133, 138 (1934)
33. Brodskij, A.I. Doklady Akad. Nauk SSSR (2)  
93, 847 - 850 (1953)  
Zurnal obščej Chim.  
24, 413 - 422 (1954)
34. Riesenfeld, E. vergl. 1 Seite 107 ff
35. Morton, P. Proc. N.A. S. 53, 363 ff (1965)  
Printz, P.  
von Hippel, H.
36. Miles, F.T. Nature ( London )  
Shearman, R.W. 138, 121 a (1936)  
Menziess, A.W.C.
37. Taylor, H.S. Amerc. chem. Soc.  
Caley, E.R. 55, 4334/35 (1933)  
Eyring , H.
38. Tronstad, L. Kgl. Norske Videnskab ,Selskabs  
Stokland, K. Ferh. 10, 141 (1937)
39. Chittum, J.P. Amerc. chem Soc.  
Lamer, V.K. 59, 2425/30 (1937)
40. Thies, E. Biol Bull.  
Carlson, F.D. 110, 295 (1956)
41. Gmelin - Hand - vergl. 29  
buch S. 1951
42. Landolt - Springer - Verlag Berlin (1968)  
Börnstein Bd. II. 5. Teil S. 72 ff  
Bd. II. 5. Teil S. 204 ff  
Bd. II. 5. Teil S. 3 ff
43. Urey, H.C. J. chem. Soc. 1947 562 - 581

44. Lewis, G.N. J. Am. Soc.  
Comish, R. C. 55, 2616/17 (1933)
45. Urey, H.C. Rev. modern Phys.  
Teal, G.K. 34 / 94 (1935)
46. Schaafs, W. Z. Phys. 114, 110 - 115 (1939)
47. Tammann, G. Z. anorg. Chemie  
Büchner, A. 22, 371 - 381 (1935)
48. La Mer, V.K. J. Americ. Soc.,  
Eichelberger, W.C. 56, 248/49 (1934)
49. Megaw, H.D. Nature 134, 900/1 (1934)
50. King, G.W. Phys. Rev. (2)  
Hainer, R.M. 71, 433 - 443 (1947)  
Cross, P.C.
51. Flood, H. Z. phy. Chem. A  
Tronstad, L. 175, 347 - 352 (1936)
52. Lewis, G.N. J. chem. Phys.  
Mac Donald, R.T. 1, 341 - 344 (1933)
53. Cotton, F. Anorg. Chemie , 200 (1967)  
Wilkinson, G. Weinheim , Verlag Chemie
54. Wein, G. Ch. - Ing. Techn.  
30, 433 - 440 (1958)
55. Harteck, K. Fiat - Review S. 185 - 186
56. Kückler, L. Ch. - Ing. Techn.  
32, 773 - 781 (1960)
57. Katz, J.J. Seesion D - 14 P / 860  
Crespi, H. USA  
Finkel, A.  
Hasterlik, R.  
Thomson, F.  
Lester, W.  
Chorney, W.  
Scully, N.
58. Henderson, Arch. Biochem. Biophys.  
Dacus, 122, 3 , 599 - 604 (1967)

59. Reitz, O. Naturwissenschaften  
Bonhoeffer, K.F. 22, 744 (1934)
60. Reitz, O. Z. physik. Chem. A.  
Bonhoeffer, K.F. 174, 424 - 434 (1935)
61. Fischer, A. Protoplasma  
26, 51 - 55 (1936)
62. Bray, D.A. Proc. Soc. exp. Biol. Med.  
Thomson, J.F. 111, 380 - 383 (1962)
63. Henderson, Proc. Soc. exp. Biol. Med.  
Dinning, 110, 208 - 211 (1962)  
Dicken,
64. Berns, 141<sup>st</sup> ACS - Meeting Washington  
Crespi, H. 84, 496 (1962)  
Katz, J.J.
65. O'Brien Proc. Soc. exp. Biol. Med.  
112, 186 - 188 (1963)
66. Thomson, J.F. Biochem. Pharmacology  
Klippel, F.J. 3, 283 (1960)
67. Siegel, Proc. natur. Ac. Sci. USA  
Galston, 56, 1040 - 1042 (1966)
68. Lovett, S. Nature London  
203, 429 - 430 (1964)
69. Brandt, W. Klinische Wochenschrift  
41, 1453 (1935)
70. Thomson, J.F. Arch. Biochem. Biophys.  
90, 1 - 6 (1960)
71. Henderson, Arch. Biochem. Biophys.  
Lamonds 115, 187 - 191 (1966)
72. Rittenberg, S.M. Biochem. Biophys. Res. Comm.  
Kahn, 27, 4484 - 487 (1967)
73. Thomson, J.F. Proc. Soc. exp. Biol. Med.  
Nance, S.H. 122, 505 (1966)  
Bush,

74. Flashner, Lukton, Biochim. biophys. Acta  
Amsterdam, 146, (2) 596 (1967)
75. Brandts, J.F. Thermobiology  
Academic Press London u. New York  
25 ff (1967)
76. Rokop, S. Biochim. et Biophys. Acta  
Gajda, L. 191, 707 - 715 (1969)  
Parmerter, S.  
Crespi, H.L.  
Katz, J.J.
77. Thomson, J.F. Biochem. Pharmacology  
Bray, D.A. 11, 943 - 948 (1962)  
Bummert, J.J.
78. Thomson, J.F. Biochim. Biophys. Acta  
Nance, S.H. 99, 369 - 371 (1965)
79. Hattori, H. Biochemistry ( Washington )  
Crespi, H.L. 4, 1213 (1965)  
Katz, J.J.
80. Lohmann, W. Strahlentherapie  
138, 739 - 741 (1969)
81. Hevsey, G. Nature  
Hefer, E. 133, 495 (1934)
82. Warburg, O. The metabolism of Tumors  
Constable, London (1930)
83. von Ardenne, M. Klinische Wochenschrift  
Elsner, J. 44, 503 (1966)  
Krüger, W.  
Reitnauer, P.G.  
Rieger, F.
84. von Ardenne, M. Theoretische und experimentelle  
Grundlagen der Krebs - Mehr -  
schritt - Therapie  
VEB Verlag Volk u. Gesundheit  
Berlin (1967)

85. von Ardenne, M.  
Rieger, F. Syncarcinolyse in Gestalt der  
Mehrschritt - Chemotherapie  
Vortrag Heidelberg Krebsfor -  
schungszentrum 25.9.1965
- 85a. von Ardenne, M  
Reitnauer, P.G. Archiv f. Geschwulstforschung  
26, Heft 3 184 - 185 (1965)
86. von Ardenne, M.  
Rieger, F. Z. Naturforschung  
21b 472 (1966)
87. Rauen, H.M. Z. Krebsforschung  
22b, 1017 (1966)
88. Bergmeyer, H.U. Enzymatische Analyse  
Verlag Chemie Weinheim, 2. Aufl.  
1425 ff (1970)
89. Schramm, T.  
Bender, E. Acta biol.et medica Germanica  
16, K 17 - K 21 (1966)
90. Giovanallla, B.C.  
Lohmann, W.A. Cancer Research  
30, 1631 - 1632 (1970)  
Heidelberger, C.
91. Love, R.  
Soriano, R. Cancer Research  
30, 1525 - 1533 (1970)  
Walsh, R.
92. Selawry, O.  
Goldstein, M. Cancer Research  
17, II 785 - 791 (1957)  
Mc Comick, T.
93. Bender, E.  
Schramm, T. Acta biol. med. Germanica  
17, 527 - 543 (1966)
94. von Ardenne, M. Naturwissenschaften  
52, 419 ff (1965)
95. von Ardenne, M. Naturwissenschaften  
52, 645 (1965)
96. von Ardenne , M. Das dt. Gesundheitswesen  
20, 1935 - 1940 (1965)
97. von Ardenne, M. ibid , 20, 661 - 666 (1965)

- 97a. Friedgood, H. Arch. f. experim. Zellf.  
7, 243 - 248 (1928/29)
98. Warocquier, R. European J. Biochem.  
Scherrer, K. 10, 362 - 370 (1969)
99. Muckle, D.S. The Brit. J. of Cancer  
Dickson, J.A. Vol. XXV , 771 ff (1971)
100. Krug, Hübner Experientia Basel  
Hamsch, Ludewig 22, 683 (1966)
101. Ling, G.N. Thermobiology  
Academic Press London, New York  
S. 5 ff (1967)
102. Warburg, O. Zt. für Naturforschung  
Gawehn , K. 13b, Heft 9 587 ff (1958)  
Geissler, A.W.
103. Dulbecco, R. J. Exp. Med.  
Vogt, M. 99, 167 (1954)
104. Youngner, J.S. J.S. Proc. Soc. Exp.Biol.Med.  
85, 202 - 205 (1954)
105. Pyari Mohan Misra Current Science  
17, 447 - 453 (1967)
106. Karlson, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie  
Verlag Thieme , Stuttgart  
S. 131 (1970)
107. Taylor, H. J. Cell. Comp. Physiol.  
Swingle, W. 4, 1 (1933)  
Eyring, H.  
Frost, A.
108. Macht, D.I. J. Am. Chem. Soc.  
Davis, B. 56, 246 (1934)
109. Lehr, E. Naturwissenschaften  
Wenzel, M. 57, 521 - 524 (1970)  
Werner, G.
110. Broom, B. Thermobiology  
Academic Press, London, New York  
S. 511 ff (1967)

111.   Chapmann, D.                   Thermobiology  
                                  Academic Press, London, New York  
                                  S. 123 ff (1967)
112.   Mao, C.                       Sci. sinica  
      Huang, C.                   14, 885 - 890 (1965) Peking
113.   Goetze, O.                   Dt. Z. für Chirurgie  
      Schmidt, K.H.               243, 623 - 670 (1931)
114.   Frank, H.K.                   Experientia 23/9 S. 786 (1967)
115.   Haeser, P.E.                 Naturwissenschaften  
      Lehr, E.                   59, 123 (1972)  
      Werner, G.
116.   Lin, S.L.                   J. Pharm. Sci.  
      Blacke, M.J.               54, 354 (1965)  
      Siegel, F.P.
117.   Dahlheim, H.               Naturwissenschaften  
      Hübner, G.               56, 89 (1969)
118.   Jenerick, H.               Am. J. Physiol.  
                                 207, 944 ff (1964)
119.   Garby, L.                   Acta phys. Scand.  
      Nordqvist, P.              34, 162 - 168 (1955)
120.   Spyripoulos, C.S.          Am. J. Physiol.  
      Ezzy, M.E.               197, 808 (1959)
121.   Tower, D.B.               Biochem. Pharmacol.  
      Tower, D.A.               19, 1015 (1970)
122.   Müller-Mohnssen, H.       Pflügers Arch.  
      Albrecht-Bühler, G.       305, 65 - 75 (1969)
123.   Mann, H.                   Fisch und Fang  
                                 11, Jahrgang 7 (1966)
124.   Mann, H.                   Der Fischwirt Nr. 5 (1966)
125.   Mann, H.                   Allg. Fischerei Zt.  
                                 87, Heft 23 (1962)
126.   Mann, H.                   Allg. Fischerei Zt.  
      Rajbanshi, K.G.           Heft 1 (1967)

127. Bové, F.J. MS - 222 - Sandoz , Anästhetikum  
und Sedativum für Fische, Frösche  
und andere Kaltblütler  
Sandoz - Basel - Nürnberg
128. Lamaque, P. Pisciculture Française  
Heft Nr. 7 (1966)
129. N.N. Aquariummagazin  
Heft Nr. 7 (1967)
130. Wenzel, M. Naturwissenschaften  
Meyer, F. 59, 316 - 317 (1972)  
Lehr, E.  
Werner, G.
131. Susina, Hiter J. Pharmacol. Sci.  
51, 1166 - 1169 (1962)
132. Kalow, W. J. Pharmacol.Exper.Therapie  
Baltimore , 104, 122 (1952 a)
133. Augustinsson, K.B. Arzneimittelforschung  
Aulendorf, 4, 242 (1954)
134. Kalow, W. Naunyn - Schmiedbergs Arch.  
exper. Path. 215, 370 (1952b)
135. Takeda, H. Acta Med. et Biolog.  
2, Nr. 2 (1954)
136. Schmidt, K.F. Anestheology  
25, Nr. 4 563 ff (1964)
137. Reidenberg, M. Clin. Pharmacol. Ther.  
James, M.J. 13, Nr. 2 279 (1971)  
Dring, L.G.
138. Burgen, A.S.V. Brit. J. Pharmacol.  
Keele, C.A. 3, 128 (1948)
139. Brodie, B.B. J. Pharm. Exp. Ther.  
Lief, P.A. 94, 359 ff (1948)  
Poet, R.
140. Hausschild, F. Pharmazie 5, 105 - 107 (1950b)

141. Rosenberg, B. J. Pharm. Exp. Ther.  
Lief, P.A. 95, 257 ff (1949)  
Mark, L.C.  
Steele, J.M.  
Brodie, B.B.  
Kayden, H.J.
142. Soehring, K. Pharmazie 4, 319/25 Nr. 7 (1949)
143. Büchi, J. Beziehungen zwischen den physi-  
Perla, X. kalisch - chemischen Eigenschaften  
und d. Wirkung von Lokalanästhe -  
tika Editio Cantor, Aulendorf  
(1962)
144. Wenzel, M. Praktikumsvorschrift FU Berlin  
Pharm. Inst. - Isotopenabt.  
(1971)
145. Dickson, J. Cancer Research  
Muckle, D. 32, 1916 - 1923 (1972)
146. Goetze, O. Archiv klin. Chirurgie  
152, 49/51 (1928)
147. Vollmar, H. Zt. für Krebsforschung  
51, 71- 99 (1940)
148. Lampert - Höxter Körpereigene Abwehr und bös -  
artige Geschwülste  
Haug - Verlag , Ulm (1957)
149. Gericke, D. Naturwissenschaften  
Chandra, P. 58, Heft 3 155 - 156 (1971)  
Orie, H.  
Wacker, A.
150. Overgaard, K. Europ.J. Cancer  
und J. Vol. 8 573 - 575 (1972)
151. von Ardenne, M. Naturwissenschaften  
Chaplain, R.A. 55, Heft 9 448 (1968)
152. Szybalski, W. Thermobiology  
Academic Press, London , New York  
S. 73 ff (1967)

- 152a. Moner, J. Thermobiology  
Academic Press, London, New York  
S. 67 ff (1967)
153. Alexander, L. C.I.O.S. , Nr. 24, Washington  
(1946)
154. Cooper, K.E. Brit. med. Bull.  
17, 48 ff (1961)
155. Duguid, H. Lancet, ii, 1213 (1961)  
Stowers, J.M.  
Simpson, R.G.
156. Giaja, J. Compt.rend. Acad. Sci.  
Andjus, R. 229, 1170 (1949)
157. Gerhards, E. Arzneimittelforschung  
Raspé, G. 17, 431 (1967)  
Wiechert,
158. Gmelin - vergl. 29 S. 2013  
Handbuch
159. Wenzel, M. Analytical Biochem.  
Stöhr, W. 37, Nr. 2 282/83 (1970)
160. Süß, R. Naturwissenschaften  
Volm, M. 55, 134 (1968)
161. Wegener, L. A. Atompraxis  
Winckelmann, H. 16, Heft 1 Jan./Febr. 1970
162. Simon, E.W. New Phytologist  
Beevers, H. 51, 163 und 191 (1951)
163. Daniels, T.C. Textbook of Organic Medicinal  
Kumler, D.W. and Pharmaceutical Chemistry  
edited by C.O. Wilson and O,  
Gisvold, Philidelphia, Third  
Ed. 1956, p. 12
164. Albert, A. Pharmacol.Rev.  
4, 136 (1952)
165. Rahm, O. Ind. Engl. Res.  
Conn, J.E. 36, 185 (1944)

166. Richardson, C.H. J. agric. Res.  
Shepard, H.H. 41, 337 (1930)
167. Gros, O. Arch.exp. path.Pharmacol.  
62, 380 (1910)  
63, 80 (1910)
168. Sollmann, T. J. Pharmacol exp. Ther.  
11, 1 (1918)
169. Lendle, L Arch.exp. path. Pharmacol.  
125, 287 (1927)
170. Lendle, L. Arzneimittelforschung  
Mohrmann, J.E. 5, 249 (1955)
171. Doerffil , K . Beurteilung von Analysenverfahren  
und - ergebnissen , S. 64 ff  
Springer - Verlag Berlin (1965)
172. Sachs, L. Statistische Auswertmethoden  
Springerverlag , Berlin (1969)  
2. Auflage S. 428 ff
173. Ther, L. Grundlagen der experimentellen  
Arzneimittelforschung  
Wissenschaftlicher Verlag  
Stuttgart, (1965)
174. Mißbach, Abh. dt. Akad. Wiss. Berlin  
Jung, 1964, 541 - 544 (1965)  
Hübner,



## LEBENS LAUF

Am 20. September 1943 wurde ich als zweiter Sohn des leitenden Oberpostdirektors Albert Meyer und seiner Ehefrau Ilse ,geb. Schwitzko , in Pillau / Ostpr. geboren .

Im April 1950 wurde ich in die evangelische Volksschule am Muhrenkamp in Mülheim a.d. Ruhr eingeschult und wechselte nach vier Jahren zum Staatlichen Gymnasium über . Ab Juni 1955 besuchte ich das Gymnasium am Moltkeplatz in Krefeld; dort bestand ich am 1. März 1963 die Reifeprüfung .

Meine Berufsausbildung als Apotheker begann ich am 1. April 1963 mit der zweijährigen Praktikumszeit in der Dreikönigen - Apotheke in Krefeld . Am 19. März 1965 absolvierte ich vor dem Prüfungsausschuß in Düsseldorf die pharmazeutische Vorprüfung .

Vom Wintersemester 1967/68 ab studierte ich an der Freien Universität in Berlin Pharmazie und bestand am 20. Oktober 1970 vor dem Prüfungsausschuß in Berlin die pharmazeutische Prüfung . Im Anschluß daran begann ich am 15. November 1970 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Wenzel mit der vorliegenden Arbeit .

Am 5. März 1971 heiratete ich die Kinderkrankenschwester Dagmar Schulz.

Zum 30. Januar 1973 erhielt ich die Approbation als Apotheker.

Am 4. Juni 1973 wurde unser Sohn Lars geboren .

Zur Zeit bin ich wissenschaftlicher Assistent an der FU Berlin .





